

Fernanda Kokowicz Pilatti

**ULTRAESTRUTURA, BIOQUÍMICA E *fingerprint*
METABÓLICO DE *Ulva lactuca* Linnaeus (CHLOROPHYTA)
APÓS EXPOSIÇÃO AGUDA AO DIESEL E À GASOLINA**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Maraschin

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Zenilda L.

Bouzon

Florianópolis

2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Pilatti, Fernanda Kokowicz
Ultraestrutura, bioquímica e fingerprint metabólico de
Ulva lactuca Linnaeus (Chlorophyta) após exposição aguda ao
diesel e à gasolina / Fernanda Kokowicz Pilatti ;
orientador, Marcelo Maraschin ; coorientadora, Zenilda
Laurita Bouzon. - Florianópolis, SC, 2016.
143 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Inclui referências

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. *Ulva*
lactuca. 3. Bioquímica vegetal. 4. Metabolômica. 5.
Hidrocarbonetos. I. Maraschin, Marcelo. II. Bouzon,
Zenilda Laurita. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do
Desenvolvimento. IV. Título.

Fernanda Kokowicz Pilatti

**ULTRAESTRUTURA, BIOQUÍMICA E *fingerprint*
METABÓLICO DE *Ulva lactuca* Linnaeus (CHLOROPHYTA)
APÓS EXPOSIÇÃO AGUDA AO DIESEL E À GASOLINA**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutor”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento

Florianópolis, 29 de agosto de 2016.

Prof.^a Yara Maria Rauh Muller, Dr.^a
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Marcelo Maraschin, Dr.
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Zenilda Laurita Bouzon, Dr.^a
Co-orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Leonardo Rorig, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Eder Carlos Schimdt, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Paulo Horta, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Natália Pirani Ghilardi-Lopes, Dr.^a
Universidade Federal do ABC

Prof. Rosendo Yunes, Dr.
Universidade do Vale do Itajaí

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Marcelo Maraschin e Prof^ª. Dr^ª. Zenilda Laurita Bouzon, por terem aceitado orientar meu trabalho, dividido comigo seus conhecimentos e me ensinado muito de ciência e de vida ao longo desta jornada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, professores, técnicos e colegas.

À CAPES, pelo suporte financeiro na forma das bolsas CAPES-REUNI, CAPES-DS e PDSE.

Ao Prof. Dr. Miguel Rocha, da Universidade do Minho, por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa durante um ano incrível, de muitos aprendizados técnicos e crescimento pessoal.

À Dr^ª. Fernanda Ramlov e ao Dr. Eder Schmidt, por todos os ensinamentos de Bioquímica e Biologia Celular que sustentam este trabalho.

Às equipes do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV), Laboratório de Biologia Celular Vegetal (LaBCeV) e grupo de investigação Bisbii (Universidade do Minho), pelas colaborações profissionais e pelas amizades.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) e ao Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB), da Universidade Federal de Santa Catarina e aos seus técnicos, por disponibilizar a infraestrutura e dar todo o suporte para a realização das análises de microscopia eletrônica e óptica, respectivamente.

Finalmente, aos meus pais, por eventualmente duvidarem, mas sempre apoiarem minhas escolhas. À minha família e meus amigos (que são a família que eu encontrei pelo mundo), que ficaram nos bastidores dividindo os cafés e os sushis, as alegrias e tristezas da vida acadêmica, ouvindo minhas reclamações, compreendendo minhas ausências, tentando entender que eu não "só estudo" e "para que serve" a minha pesquisa, achando graça na minha empolgação de bióloga, e sempre oferecendo abraços reconfortantes e palavras de incentivo, torcendo pelo meu sucesso e comemorando comigo cada conquista.



RESUMO

Os combustíveis fósseis são responsáveis por uma fração considerável da poluição que atinge os ecossistemas marinhos, sendo a gasolina e o óleo diesel são os mais consumidos no mundo. As macroalgas possuem grande importância ecológica em muitos ecossistemas marinhos, porém poucas pesquisas têm sido realizadas objetivando elucidar os efeitos de hidrocarbonetos derivados do petróleo sobre estes organismos, em comparação ao número de publicações que utilizam microalgas, invertebrados e vertebrados como objeto de estudo. *Ulva lactuca* (Chlorophyta) foi escolhida como modelo biológico neste estudo por ser uma espécie cosmopolita, conhecida por sua tolerância a ambientes impactados por efluentes domésticos e industriais e capacidade de bioacumular metais pesados. Os efeitos do óleo diesel e da gasolina, em combinações de concentrações (0,001%, 0,01%, 0,1%, 1,0%) e tempo de exposição (30 min, 1 h, 12 h, 24 h), foram investigados sobre a ultraestrutura, bioquímica e metabolômica de *U. lactuca*. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) revelou que 1 h de exposição ao óleo diesel e à gasolina já é suficiente para provocar alterações drásticas na mucilagem dos talos, um efeito que se mantém após 12 h e 24 h de exposição. Com a análise citoquímica com Azul Brilhante de Coomassie (CBB) observou-se que a exposição à gasolina provoca desorganização e aglutinação da porção proteica citoplasmática, possivelmente atingindo sistemas enzimáticos das membranas das organelas, um efeito menos intenso nos talos expostos ao diesel. Flutuações nos conteúdos de clorofilas *a* e *b* e no perfil de carotenoides foram detectadas em talos expostos ao óleo diesel, embora tais diferenças não foram relacionadas à concentração do combustível ou ao tempo de exposição. A exposição ao diesel também causou redução no conteúdo de polifenóis em relação ao grupo controle e aumento dos conteúdos de açúcares solúveis e de amido, principalmente após 12 h. Talos expostos à gasolina também apresentaram alterações nos conteúdos de clorofilas *a* e *b*. Constatou-se que a redução dos teores de carotenóides e de polifenóis, e o aumento dos conteúdos de açúcares solúveis e de amido é função direta em relação ao tempo de exposição a este combustível. O conjunto de resultados obtidos por MEV, citoquímica e bioquímica indica que a exposição aguda de *U. lactuca* à gasolina causa danos mais intensos à estrutura celular do que a exposição ao diesel, possivelmente devido à alta permeabilidade dos hidrocarbonetos aromáticos e do etanol presentes na gasolina brasileira. Adicionalmente, verificou-se que os pigmentos fotossintetizantes e suas rotas biossintéticas são menos

suscetíveis às agressões dos combustíveis. O aumento dos teores de açúcares solúveis e de amido nos talos expostos aos xenobióticos sugere que os hidrocarbonetos podem ser metabolizados via Ciclo do Ácido Cítrico, conferindo a esta espécie um papel importante desta espécie na biorremediação dos ecossistemas. Ademais, especula-se que os conteúdos de polifenóis, açúcares solúveis, amido, associados à citoquímica com CBB, podem ser usados em conjunto como biomarcadores para poluição por óleo diesel e gasolina em *U. lactuca*. O estudo do metaboloma via espectroscopia vibracional de infravermelho (FTIR) e análise multivariada de dados (HCA, PCA, *k-means*) permitiu discriminar a maioria das amostras segundo o xenobiótico de interesse. Quando os grupos expostos ao diesel e à gasolina foram analisados separadamente, a análise do intervalo espectral de absorbância das proteínas permitiu o melhor agrupamento das amostras. Os talos expostos ao óleo diesel foram melhor agrupados de acordo com a concentração deste xenobiótico, enquanto aqueles expostos à gasolina foram melhor discriminados de acordo com o tempo de exposição ao combustível. A abordagem analítica ao estudo do metaboloma de *U. lactuca* mostrou-se eficiente para discriminar alterações bioquímicas consoante à exposição aguda aos xenobióticos. Por se tratar de uma metodologia simples, rápida, sensível e barata possui potencial para desenvolvimento de protocolo de rotina a estudos de biomonitoramento.

Palavras-chave: *Ulva lactuca*. Hidrocarbonetos. Ultraestrutura. Metabolômica. Clusters hierárquicos.

ABSTRACT

Fossil fuels, such as gasoline and diesel oil account for substantial share of pollution that affects marine ecosystems. Seaweeds have important ecological roles in many ecosystems, but a few researches have been carried out aiming at to unravel the effects of oil derivatives on these organisms, comparatively to the observed for microalgae, invertebrates, and vertebrates. *Ulva lactuca* (Chlorophyta) was chosen as a biological model for this study due to its cosmopolitan habits, ability to bioaccumulate heavy metals, and tolerance to polluted environments by domestic and industrial effluents. In the present study the effects of diesel oil and gasoline, in combinations of concentrations (0,001%, 0,01%, 0,1%, and 1,0%) and times of exposure (30 min, 1 h, 12 h, and 24 h) were investigated on *U. lactuca*'s ultrastructure, biochemistry, and metabolomics. Scanning electron microscopy (SEM) images, just after 1 h of exposure to diesel oil or to gasoline revealed drastic alterations in thalli mucilage that persist after 12 h and 24 h of exposure. Coomassie Brilliant Blue (CBB) cytochemistry analysis indicated that exposure to gasoline led to disorganization and agglutination of the cytoplasm protein fraction, possibly affecting enzymes bound to organelles' membranes. This effect was lesser intense in thalli exposed to diesel oil, which exhibited little alterations in cytoplasm. Diesel oil-exposed thalli exhibited changes in chlorophyll *a* and *b* contents and in carotenoid profile not related to diesel oil concentrations or exposure times. Diesel oil also decreased the polyphenol content and increased the soluble sugars and starch amounts, specially after 12 h exposure, followed by a decrease in these metabolites after 24 h exposure. Chlorophyll *a* and *b* contents also were altered in a way not related to concentrations or times of exposure in gasoline-treated thalli. A decrease in the carotenoid and polyphenol amounts and an increase in soluble sugars and starch contents positively correlated to time of exposure were detected in gasoline-treated groups. SEM, cytochemical, and biochemical analyzes revealed higher toxicity to *U. lactuca* of gasoline than diesel oil, possibly due to the high permeability of mono-aromatic hydrocarbons and ethanol from the Brazilian gasoline blend. Importantly, results also showed that photosynthetic pigments and their biosynthetic pathways resist in a certain extension to injuries caused by gasoline and diesel oil. Besides, the augmented amounts of soluble sugars and starch suggest that hydrocarbons may have been metabolized and incorporated into *U. lactuca*'s energetic pathways, e.g. citric acid cycle. These results indicate that *U. lactuca* plays an important role on bioremediation of natural

habitats. From these results, we suggest that polyphenols, soluble sugars, and starch contents, along with CBB cytochemistry could be used as biomarkers of diesel oil and gasoline pollution in *U. lactuca*. FTIR-based metabolomics studies followed by multivariate statistical analysis (HCA, PCA, k-means) efficiently discriminated most of the the exposed groups according to the xenobiotic. When diesel oil- and gasoline-exposed groups were analyzed separately, the most accurate clusters were obtained using the spectral window corresponding to the proteins absorbances. Diesel oil-exposed thalli were better clustered according to the concentration of xenobiotic, whereas gasoline-exposed thalli were better grouped according to the time of exposure to this fuel. Since the analytical approach to metabolomics showed to be simple, fast, cheap, and sensible, it is thought to have potential for further development of protocols of routine analysis in biomonitoring studies.

Keywords: *Ulva lactuca*. Hydrocarbons. Ultrastructure. Metabolomics. Hierarchical clusters.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALS - *Asymmetric Least Squares*

ATO - Azul de Toluidina

BTEX - Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno

CBB - Azul Brilhante de Coomassie (*Coomassie Brilliant Blue*)

FSA - Fração Solúvel em Água

FTIR - espectroscopia vibracional de infravermelho com transformada de Fourier (*Fourier transform infrared spectroscopy*)

GC - Cromatografia gasosa (*Gas Chromatography*)

HC - Hidrocarbonetos

HCA - Análise de *clusters* hierárquicos (*Hierarchical Clustering Analysis*)

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência (*High Efficiency Liquid Chromatography*)

LC - Cromatografia líquida (*Liquid Chromatography*)

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MPF - *Modified Polynomial Fitting*

MS - Espectrometria de massa (*Mass Spectrometry*)

NMR - Ressonância magnética nuclear (*Nuclear Magnetic Resonance*)

PAH - Hidrocarbonetos poliaromáticos (*Polyaromatic Hydrocarbons*)

PC - Componentes principais (*Principal Components*)

PCA - Análise de componentes principais (*Principal Components Analysis*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 OBJETIVOS.....	18
1.1.1 Objetivo Geral	18
1.1.2 Objetivos Específicos	18
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	20
2.1 POLUIÇÃO MARINHA POR PETRÓLEO E SEUS DERIVADOS.....	20
2.2 MACROALGAS COMO MODELO DE ESTUDO E BIOINDICADORAS DE POLUIÇÃO	21
2.3 DIVISÃO CHLOROPHYTA.....	25
2.3.1 Classe Ulvophyceae.....	25
2.3.2 Ordem Ulvales	26
2.3.3 Gênero <i>Ulva</i>	26
2.4 METABOLÔMICA	31
2.4.1 Utilização da FTIR na metabolômica	34
2.4.2 Macroalgas como objeto de estudo na metabolômica ambiental.....	36
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 COLETA, PROCESSAMENTO E ACLIMATAÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO	39
3.2 ENSAIOS DE EXPOSIÇÃO AGUDA A DERIVADOS DE PETRÓLEO	40
3.3 MICROSCOPIA DE LUZ E CITOQUÍMICA	42
3.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	43
3.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	43
3.5.1 Dessalinização do material	43
3.5.2 Teores de clorofilas <i>a</i> e <i>b</i>	43
3.5.3 Perfil de carotenoides	44
3.5.4 Quantificação de polifenóis	45
3.5.5 Açúcares solúveis e amido.....	45
3.5.6 Análises estatísticas	46
3.6 METABOLÔMICA	47
3.6.1 Espectroscopia de infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR)	47
3.6.2 Estrutura dos dados, pré-processamento e análise.....	47
3.6.2.1 Pré-processamento dos espectros.....	47
3.6.2.2 Análise de dados	48
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49

4.1 EXPOSIÇÃO À GASOLINA	49
4.1.1 Citoquímica e microscopia eletrônica de varredura	49
4.1.2 Análise bioquímica	53
4.2 EXPOSIÇÃO AO ÓLEO DIESEL	63
4.2.1 Citoquímica e microscopia eletrônica de varredura	63
4.2.2 Análise bioquímica	66
4.3 METABOLÔMICA	76
4.3.1 Análise multivariada do perfil metabólico de talos de <i>U.</i> <i>lactuca</i> expostos à gasolina e ao óleo diesel baseado em espectroscopia vibracional de infravermelho médio (FTIR)	76
4.3.2 Análise multivariada do perfil metabólico de talos de <i>U.</i> <i>lactuca</i> expostos à gasolina	90
4.3.3 Análise multivariada do perfil metabólico de talos de <i>U.</i> <i>lactuca</i> expostos ao óleo diesel	100
4.4 DISCUSSÃO	110
5 CONCLUSÕES	115
REFERÊNCIAS	117
APÊNDICE A	131
APÊNDICE B	134
APÊNDICE C	137
APÊNDICE D	140
ANEXO A	143

1 INTRODUÇÃO

A poluição marinha por petróleo e seus derivados recebe atenção desde meados do século XIX, com a intensificação do seu uso. Embora as perturbações ambientais causadas por grandes derramamentos de petróleo em águas marinhas recebam maior atenção da população, da mídia, das agências regulatórias e da comunidade científica, a maior parcela da poluição marinha por petróleo é oriunda de combustíveis, sendo que os acidentes com navios petroleiros contribuem com apenas 5% de toda a poluição marinha. Vazamentos e derramamentos acidentais são ocorrências regulares durante a exploração, produção, refinamento, transporte e armazenamento de petróleo e seus derivados. No Brasil, a infraestrutura de extração e distribuição do petróleo e de seus derivados inclui terminais em terra e mar, centros de coleta, refinarias, quilômetros de oleodutos e milhares de caminhões-tanque que fazem a distribuição de gasolina e óleo diesel por todo o território nacional (VIEIRA *et al.*, 2007; TORRES *et al.*, 2008; LEWIS E PRYOR, 2013).

As macroalgas compõem a base dos ecossistemas costeiros, atuando como produtores primários e componentes estruturais do biótopo, fornecendo substrato para desova, berçário e abrigo de peixes juvenis. Como os demais organismos marinhos, estão expostas a uma grande diversidade de poluentes de origem antrópica, e.g., pesticidas, metais pesados, esgotos domésticos e industriais e hidrocarbonetos de petróleo. Apesar da sua importância ecológica e econômica, o conhecimento dos efeitos tóxicos de xenobióticos sobre este grupo de organismos é extraordinariamente baixo, comparativamente ao que se conhece sobre toxicidade em espécies animais. Menor ainda é a quantidade de estudos de toxicidade de petróleo e seus derivados sobre as macroalgas. Além disso, não há testes de toxicidade específicos para o petróleo, o que resulta em grande diversidade de condições experimentais e parâmetros analisados, dificultando a comparação entre os resultados (EKLUND E KAUTSKY, 2003; LEWIS E PRYOR, 2013).

De outra forma, o estudo dos efeitos tóxicos de poluentes em macrófitas, bem como a utilização destes organismos como bioindicadores de contaminação, tem crescido nos últimos anos. Neste contexto, uma espécie que se destaca por sua tolerância a contaminantes, capacidade de colonizar áreas impactadas, biotransformar e bioacumular xenobióticos, mostrando grande potencial

biorremediador e bioindicador é *Ulva lactuca* Linnaeus (Chlorophyta) (RAINBOW, 1995).

A escassez de informações sobre o efeito de derivados de petróleo sobre esta espécie motivou a realização do presente trabalho, que investiga os efeitos de sua exposição aguda ao óleo diesel e à gasolina. Estes derivados de petróleo foram escolhidos devido a sua importância, por serem os mais consumidos no Brasil e também por possuírem composições químicas muito distintas entre si, característica esta que poderá determinar importantes discrepâncias nas respostas bioquímicas e ultraestruturais de *U. lactuca*.

Hipótese de trabalho:

A exposição aguda ao óleo diesel e à gasolina é tóxica à *U. lactuca*, desencadeando mecanismos bioquímicos de defesa e alterações ultraestruturais. Tais alterações metabólicas poderão permitir a identificação de compostos candidatos a biomarcadores, caracterizando *U. lactuca* como uma espécie bioindicadora à contaminação por aqueles xenobióticos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Determinar os efeitos da exposição aguda ao óleo diesel e à gasolina sobre o metabolismo, a morfologia e a ultraestrutura de *Ulva lactuca* Linnaeus.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Identificar alterações morfológicas em *U. lactuca* exposta ao óleo diesel e à gasolina, através de microscopia de luz associada à citoquímica;
- Detectar alterações ultraestruturais celulares em *U. lactuca* após a exposição aguda ao óleo diesel e à gasolina, via microscopia eletrônica de varredura;
- Identificar alterações metabólicas em *U. lactuca* decorrentes da exposição aguda ao óleo diesel e gasolina, via quantificação de clorofilas *a* e *b*, polifenóis, açúcares solúveis e amido, e através da determinação do perfil carotenóidico;

- Discriminar os perfis metabólicos de *U. lactuca* exposta ao óleo diesel e à gasolina através da análise multivariada aplicada à espectroscopia de infravermelho.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 POLUIÇÃO MARINHA POR PETRÓLEO E SEUS DERIVADOS

Atualmente, aproximadamente 60% da população humana se concentra em uma faixa de até 100 km a partir da costa, e suas atividades, tais como a urbanização, indústria, turismo e agricultura, emitem poluentes que têm afetado significativamente a produtividade costeira dos oceanos. Tais poluentes chegam aos ambientes estuarinos e costeiros via deposição atmosférica, carregados pelas águas fluviais e por fontes pontuais ao longo da costa (ISLAM E TANAKA, 2004; NUNES *et al.*, 2011; SCHERNER *et al.*, 2012). Dentre as atividades que mais têm impacto estão os vazamentos e derrames acidentais decorridos da exploração, produção, refino, transporte e estocagem de petróleo e seus derivados (VIEIRA *et al.*, 2007). Os efeitos ambientais de grandes derramamentos de petróleo em águas marinhas têm recebido maior atenção do público, de agências reguladoras e da comunidade científica. No entanto, pouca atenção tem sido dispensada aos pequenos, mas contínuos derrames em operações de rotina que disponibilizam diversos hidrocarbonetos ao ambiente (RODRIGUES *et al.*, 2010; LEWIS E PRYOR, 2013).

No litoral brasileiro, os terminais marítimos, atracadouros e marinas representam fontes potenciais de contaminação por petróleo e seus derivados, devido a derrames acidentais durante operações de carga, descarga e abastecimento de navios e barcos de menor porte, representando uma ameaça constante à saúde da biota estabelecida nas proximidades destes empreendimentos (BRITO *et al.*, 2002). Além disso, no Brasil, a distribuição e o transporte de óleo diesel e gasolina utilizam uma rede de oleodutos e caminhões-tanque, ocorrendo eventuais vazamentos durante o transporte através de dutos mal conservados, nas operações de carregamento e descarregamento dos tanques, além da lavagem dos tanques e pátios, eventos que contaminam os efluentes e alcançam rios, lagos e o mar através da drenagem urbana (TIBURTIUS E PERALTA-ZAMORA, 2004; VIEIRA *et al.*, 2009).

A gasolina possui em sua composição hidrocarbonetos (HC) alifáticos (41% a 62%, v/v) e hidrocarbonetos aromáticos (10% a 59%, v/v), dentre os quais os monoaromáticos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno). Além dos hidrocarbonetos oriundos do petróleo, a gasolina comum brasileira (Tipo C) contém de 25 a 27% (v/v) de etanol anidro, conforme estabelecido pela Resolução ANP nº 40, de 25 de outubro de 2013 (BRASIL, 2013) e pela Resolução nº1 do Conselho

Interministerial do Açúcar e do Alcool, de 4 de março de 2015 (BRASIL, 2015). Por sua vez, o óleo diesel é uma mistura mais densa e viscosa, composta por hidrocarbonetos parafínicos (alcanos), olefínicos (alcenos) e aromáticos, contendo de 8 a 40 átomos de carbono, além de enxofre, nitrogênio, metais e oxigênio. Em sua composição também são encontrados BTEX, além de hidrocarbonetos poliaromáticos como o naftaleno (VIEIRA *et al.*, 2009; ZANETTE *et al.*, 2011). As frações solúveis em água (FSA) de gasolina e de diesel apresentam maior quantidade de BTEX, enquanto que a FSA do petróleo possui maior quantidade de hidrocarbonetos poliaromáticos (PAHs) (RODRIGUES *et al.*, 2010). Ainda que a contaminação das águas por derivados de petróleo seja menos perceptível e receba menor atenção da mídia e da população, esse tipo de poluição pode ter um impacto significativo no equilíbrio a saúde ambiental. No que diz respeito à toxicidade a organismos vivos, os BTEX oferecem maiores risco do que os hidrocarbonetos alifáticos com o mesmo número de carbonos, devido a sua mobilidade na água. A toxicidade dos HC aumenta na seguinte ordem: compostos parafínicos → naftenos → olefínicos → aromáticos. Quanto menor a cadeia carbônica alifática, mais tóxico é o composto. Dentro dos HC aromáticos, o aumento da toxicidade obedece a ordem: benzeno → tolueno → xileno, causando principalmente toxicidade aguda, enquanto os PAHs são responsáveis pela toxicidade crônica (BAKER, 1970). Além de possuir uma mobilidade maior na água, os BTEX possuem grande afinidade por lipídios, frequentemente interagindo com membranas lipídicas, gerando distúrbios enzimáticos e endócrinos, interferindo nas propriedades fisiológicas das membranas e se acumulando-se nos tecidos adiposos dos animais (TIBURTIUS E PERALTA-ZAMORA, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2010).

2.2 MACROALGAS COMO MODELO DE ESTUDO E BIOINDICADORAS DE POLUIÇÃO

Os efeitos de xenobióticos sobre um ecossistema podem ser estudados através de diversas abordagens. Na análise *in situ*, a avaliação da qualidade ambiental e a detecção de xenobióticos podem ser feitas através de organismos bioindicadores, biomonitores e sentinelas, além da análise de biomarcadores. Bioindicadores são organismos que respondem prontamente a alterações em seu ambiente, e cujas reações, ou mesmo a presença ou ausência, relacionam-se à qualidade de determinado ambiente, ou à presença de um poluente (RAINBOW, 1995; GERHARDT, 2009). Biomonitores são organismos que respondem a alterações ambientais com alterações morfológicas,

bioquímicas ou fisiológicas, informando sobre a variação dos poluentes ao longo do tempo. Os parâmetros metabólicos que mudam em resposta ao agente estressor, avaliados nestes organismos, são chamados de biomarcadores (RAINBOW, 1995; TORRES *et al.*, 2008; HAMZA-CHAFFAI, 2014). Por sua vez, sentinelas, ou bioacumuladores, são organismos capazes de acumular certos poluentes sem sofrer danos aparentes, de forma que a análise tissular destes organismos fornece estimativas das concentrações daqueles poluentes no ambiente (GERHARDT, 2009).

Em laboratório, podem ser realizados testes ecotoxicológicos sob condições controladas objetivando determinar o efeito de substâncias puras, efluentes ou amostras ambientais de constituição complexa sobre organismos representativos do ecossistema. Tais ensaios são realizados com organismos-teste, espécies cujo comportamento, genética e fisiologia são conhecidos e que apresentam, entre outras características, elevada e constante sensibilidade a contaminantes, estabilidade genética, representatividade em seu nível trófico, ampla distribuição e facilidade de cultivo em laboratório. Poucos organismos se enquadram nos pré-requisitos para serem organismos-teste, sendo que os fotossintetizantes mais utilizados são *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus subspicatus* e *Pseudokirchneriella subcapitata*, todos eles microalgas (COSTA *et al.*, 2008). Entretanto, as respostas bioquímicas (conteúdos de clorofilas, carotenoides e proteínas, atividades enzimáticas, perfil lipídico), morfológicas (estrutura da parede celular e de membranas) e fisiológicas (taxas de crescimento e reprodutiva, absorção de CO₂, taxa fotossintética, produção de O₂) de diversas espécies de algas expostas a xenobióticos têm sido estudadas *in vitro*. Estes estudos ampliam o conhecimento dos efeitos de substâncias tóxicas sobre a fisiologia e o metabolismo de diversas espécies de algas, permitindo identificar espécies candidatas a bioindicadoras e variáveis que podem ser usadas como biomarcadores.

Apesar da crescente atenção que a poluição marinha por hidrocarbonetos derivados de petróleo vem recebendo na comunidade científica, a maioria dos estudos investiga os efeitos tóxicos dos poluentes sobre a fauna, em parte por se acreditar que as algas são menos sensíveis aos poluentes. Revisões e levantamentos bibliográficos dos efeitos de diversos poluentes sobre organismos fotossintetizantes marinhos informam que a maioria dos testes é realizada com microalgas, tendo como principais variáveis analisadas a taxa de crescimento e o desempenho fotossintético dos organismos. Neste cenário, os poluentes mais investigados são os metais pesados e o petróleo (óleo bruto,

dispersantes e frações solúveis em água) (EKLUND E KAUTSKY, 2003; TORRES *et al.*, 2008; LEWIS E PRYOR, 2013).

As macroalgas são organismos macroscópicos, pluricelulares, na sua maioria marinhos e bênticos, que habitam desde a zona entremarés até profundidades por volta de 200m. São divididas em três grupos principais baseados na combinação específica de pigmentos que conferem a coloração distinta das algas de cada grupo, i.e., algas verdes (Chlorophyta), pardas (Phaeophyceae) e vermelhas (Rhodophyta) (LOBBAN E WYNNE, 1981; SUMICH E MORRISSEY, 2012). Embora tenham pequena participação no sequestro de carbono e na produção de oxigênio, as macroalgas desempenham importante papel ecológico, constituindo alimento, habitat e berçário à fauna marinha, além de participarem da biotransformação e bioacumulação de poluentes orgânicos e metais (EKLUND E KAUTSKY, 2003; TORRES *et al.*, 2008; SCHERNER *et al.*, 2012; LEWIS E PRYOR, 2013).

De acordo com LEWIS E PRYOR (2013), ao menos 135 organismos fotossintetizantes aquáticos, dentre eles, apenas 32 espécies de macroalgas, foram expostos a 41 tipos de petróleo e 56 dispersantes, correspondendo a menos de 10% do total de registros para toxicidade testados em organismos. Ainda de acordo com estes autores, listas de prioridades e de recomendação à avaliação da toxicidade por petróleo, misturas e surfactantes não consideram os efeitos sobre os produtores primários. Em outra revisão, EKLUND E KAUTSKY (2003) demonstraram que a toxicidade de 120 substâncias, das quais apenas 14% eram petróleo, foi testada em 28 espécies de algas pardas, 26 espécies de algas vermelhas e 11 espécies de algas verdes. O crescimento, a respiração, a fotossíntese e a reprodução foram as variáveis de maior frequência de uso à avaliação da toxicidade dos compostos nos organismos. A carência de testes padronizados para macroalgas e a composição variável de matrizes complexas como o petróleo e seus derivados resultam em uma ampla diversidade de espécies estudadas, desenhos experimentais e parâmetros analisados, tornando difícil a compilação e comparação de resultados (EKLUND E KAUTSKY, 2003; LEWIS E PRYOR, 2013). Entretanto, testes toxicológicos padronizados que avaliam o crescimento da alga vermelha *Gracilaria tenuistipitata* C.F.Chang & B.M.Xia e a reprodução das algas vermelhas *Ceramium strictum* Greville & Harvey e *Champia parvula* (C.Agardh) Harvey, das algas pardas *Laminaria saccharina* (Linnaeus) J.V.Lamouroux e *Fucus spiralis* Linnaeus e da alga verde *Ulva pertusa* Kjellman já foram publicados (EKLUND, 1993; EKLUND, 1998; STEELE E THURSBY, 1995; HAGLUND *et al.*, 1996; HAN E CHOI, 2005; HAN *et al.*, 2007).

Declínios de biodiversidade e alterações de comunidades macroalgais devido a impactos antropogênicos são reportados na literatura, sendo que algumas espécies de macroalgas têm sido utilizadas preferencialmente como bioindicadoras de poluição, tanto por sua tolerância quanto por sua sensibilidade aos poluentes (CASTILLA, 1996; MARTINS *et al.*, 2012, CHAKRABORTY *et al.*, 2014). Neste sentido, vários trabalhos têm reportado a sensibilidade de macroalgas marinhas à poluição por metais pesados (BOUZON *et al.*, 2012; GOUVEIA *et al.*, 2013, SANTOS *et al.*, 2014) e a bioacumulação de poluentes orgânicos como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), policlorinatos de bifenila (PCBs), e pesticidas (PHILLIPS, 1978; MONTONE *et al.*, 2001; PAVONI *et al.* 2003; TORRES *et al.*, 2008;).

Marcadores bioquímicos, fisiológicos e histológicos foram utilizados para determinar os efeitos de hidrocarbonetos derivados de petróleo em algumas espécies de larvas de peixes e moluscos bivalves (STEPHENS *et al.*, 1997; SIMONATO *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2010; ZANETTE *et al.*, 2011) mas essa abordagem para macroalgas ainda é pouco descrita na literatura.

Esta lacuna gerou o interesse de nosso grupo de pesquisa, que decidiu investigar os efeitos da exposição aguda ao óleo diesel e à gasolina sobre espécies dos três grupos de macroalgas: vermelhas (*Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamouroux), pardas (*Sargassum cymosum* var. *stenophyllum* (Martius) Grunow), e verdes (*Ulva lactuca*). Após exposição aguda ao óleo diesel, *H. musciformis* apresentou alterações metabólicas (redução nos conteúdos de clorofila *a* e de polifenóis), estruturais (redução no volume celular e na quantidade de grânulos de amido das florídeas), e morfológicas nos cloroplastos e na superfície da parede celular (RAMLOV *et al.*, 2013). Em *S. cymosum* var. *stenophyllum*, a exposição aguda à gasolina e ao óleo diesel resultou no incremento de conteúdos de clorofilas *a* e *c*, redução no teor de polifenóis, espessamento da parede celular e aumento do tamanho de cloroplastos, entre outras alterações morfológicas (RODRIGUES, 2014). Estes resultados evidenciam diferenças metabólicas entre grupos botânicos distintos em resposta aos mesmos xenobióticos e corroboram O'BRIEN E DIXON (1976) e BAKER (1970), que afirmam que a tolerância ou suscetibilidade a diversos hidrocarbonetos de petróleo é um caráter genótipo-dependente.

Assim, considerando os resultados dos efeitos do óleo diesel e da gasolina sobre as espécies de macroalgas pardas e vermelhas, *Ulva lactuca* foi escolhida como modelo de estudo representante do grupo de macroalgas verdes, por ser uma espécie amplamente distribuída pelo

planeta e possuir dominância oportunista relacionada à poluição antropogênica (MARTINS *et al.*, 2012; SCHERNER *et al.*, 2012).

2.3 DIVISÃO CHLOROPHYTA

A Divisão Chlorophyta é um grupo altamente diversificado quanto à forma: organismos unicelulares ou coloniais, flagelados e não flagelados, filamentos ramificados ou não, cenocíticos multinucleados. Engloba cerca de 1200 espécies de algas verdes bentônicas, além das microalgas, sendo considerada uma das mais diversificadas entre as divisões de algas. As clorófitas são majoritariamente dulcícolas, sendo que apenas 10% de seus representantes são marinhos. Neste ambiente, ocorrem principalmente em regiões entremarés e submersas, em profundidades de 10 a 200 m, utilizando tanto substratos não-consolidados, como areia e sedimentos, quanto costões rochosos. Além disso, toleram ambientes com constante variação de salinidade, sendo as principais colonizadoras de águas salobras e hipersalinas como ambientes lagunares e estuários. As clorófitas marinhas bentônicas são predominantemente pluricelulares (LEE, 2008; PEDRINI *et al.* 2011).

Seus representantes apresentam clorofilas *a* e *b* como pigmentos principais, semelhante às plantas terrestres, além de carotenoides, sendo a luteína e o β -caroteno os carotenoides majoritários. O principal polissacarídeo de parede celular é a celulose, embora xilanas e mananas possam estar presente em grande quantidade em alguns grupos. Diferentemente de outras algas eucariotas, produzem e armazenam amido nos cloroplastos, geralmente em associação a um pirenoide - região proteica do cloroplasto associada à formação do material de reserva (LEE, 2008; GRAHAM, GRAHAM E WILCOX, 2009).

2.3.1 Classe Ulvophyceae

De acordo com os mais recentes estudos filogenéticos, a Divisão Chlorophyta apresenta três classes, dentre elas, a Ulvophyceae (Anexo A). Seus representantes podem se apresentar como organismos unicelulares ou coloniais, flagelados ou não, ramificados, foliáceos e cenocíticos. Engloba mais de 100 gêneros e 1100 espécies, sendo a maioria marinha (LEE, 2008; LELIAERT *et al.*, 2012).

2.3.2 Ordem Ulvales

Ulvales é uma das seis ordens de Ulvophyceae. Os organismos desta ordem habitam costões rochosos, aderidos a superfícies estáveis, embora alguns representantes ocorram em regiões estuarinas. Possuem forma predominantemente laminar, compostos por uma ou duas camadas de células, podendo também apresentar talo tubular. Sua morfologia se deve à associação com bactérias que vivem na superfície do talo e secretam um fator morfogenético denominado talusina, que é absorvida pela alga e induz a organização das células na forma de lâmina. Quando cultivada na ausência de tais bactérias, *Ulva* sp. perde sua morfologia típica (LEE, 2008; GRAHAM, GRAHAM E WILCOX, 2009).

2.3.3 Gênero *Ulva*

Ulva é um dos principais gêneros da Família Ulvaceae, Ordem Ulvales. É conhecida popularmente como alface-do-mar e pode ser utilizada em saladas e sopas. Este gênero possui 127 espécies distribuídas por todos os oceanos. No Brasil, é encontrada desde o Maranhão até o Rio Grande do Sul. Possui talo pluricelular macroscópico diestromático, isto é, formado por duas camadas de células, podendo atingir 1m de comprimento, sendo ereto, foliáceo expandido e fixando-se ao substrato por células rizoidais na base do apressório (Figura 1) (LEE, 2008; PEDRINI *et al.* 2011).

Cada célula vegetativa de *U. lactuca* caracteriza-se por conter um vacúolo que ocupa cerca de 60% do volume da célula, e um único cloroplasto, que ocupa grande volume celular e localiza-se na periferia celular, voltado à superfície do talo (Figura 2) (WEST E PITMAN, 1967). A parede celular das algas pode ser compreendida como um sistema de duas fases, uma fase cristalina, que forma o esqueleto da parede celular, embebida na fase amorfa, considerada a matriz. A parede celular de *U. lactuca* é composta majoritariamente por dois polissacarídeos: celulose, que forma o esqueleto da parede celular, e ulvana, polissacarídeo sulfatado que constitui a matriz. A ulvana é um polissacarídeo sulfatado altamente ramificado, solúvel em água e álcali, composto por sulfato (16-32%) e unidades de ramnose (16,8-45%), xilose (2,1-12%), ácido glucurônico (6,5-19%), e glucose (0,5-6,4%), conferindo à matriz forte caráter ácido (KLOAREG E QUATRANO, 1988; LAHAYE E ROBIC, 2007). No modelo proposto por LAHAYE *et al.* (1998), a periferia da parede celular de *U. lactuca* apresenta maior

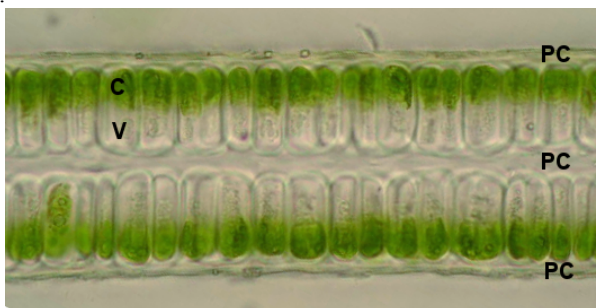
quantidade de glucuronana, enquanto que a ulvana se concentra na porção medular entre as duas camadas de células. Junto à membrana celular há concentração de glucuronana, xiloglucanas e celulose (Figura 3 A). Neste modelo, os polímeros de ulvana se dispõem em forma de rede e se associam a glucuronanas, xiloglucanas, proteínas e às fibras de celulose, que se estendem de forma linear (Figura 3 B).

Figura 1 - Talo de *Ulva lactuca* L.



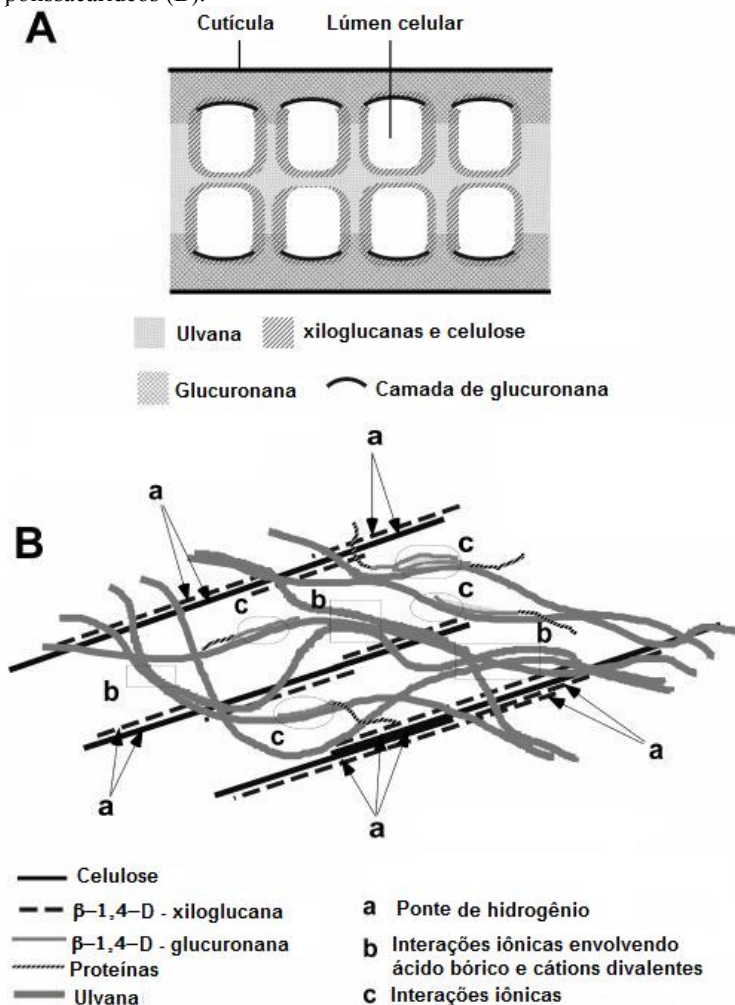
Fonte: The Seaweed Site.

Figura 2 - Micrografia de luz de uma secção transversal do talo de *Ulva* sp. O talo apresenta duas camadas de células mais longas do que largas. O cloroplasto (C) e o citoplasma se concentram próximos à superfície da célula. O vacúolo (V) ocupa cerca de 60% do volume celular. A parede celular (PC) é facilmente observada.



Fonte: Laboratório de Botânica Marina.

Figura 3 - Distribuição dos polissacarídeos de parede celular de *Ulva* sp. em uma secção transversal esquemática do talo (A) e sugestão das associações entre os polissacarídeos (B).

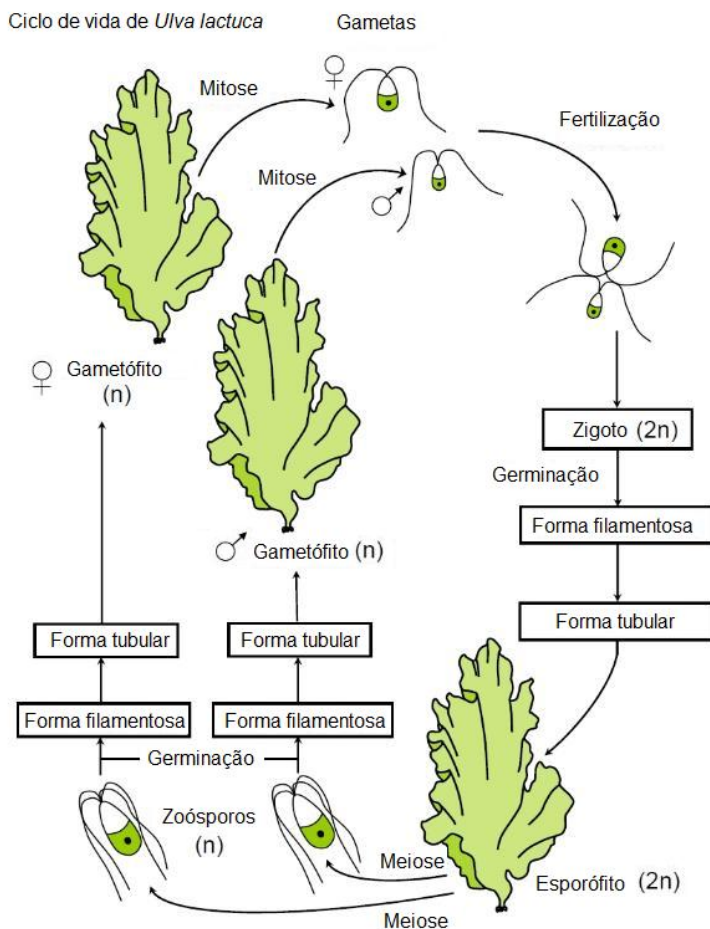


Fonte: LAHAYE *et al.* (1998).

O ciclo de vida de *U. lactuca* (Figura 4) apresenta alternância de gerações isomórficas entre um talo haploide (gametófito) e um talo diploide (esporófito). Apresenta reprodução sexuada a partir de gametas biflagelados e reprodução assexuada por fragmentação do talo, pelo crescimento de novos talos e pela produção de zoósporos

quadriflagelados (LEE, 2008; PEREIRA *et al.*, 2011). Tanto os zoósporos quanto os gametas se localizam nas margens dos talos, que mudam de coloração de verde-vivo para verde-oliva, ou marrom-esverdeado, resultado do acúmulo de γ -caroteno, quando as células reprodutivas estão amadurecendo. A liberação destas células resulta na desintegração parcial do talo, que persiste no ambiente aderido ao substrato pelo apressório, regenerando-se (LEE, 2008; GRAHAM, GRAHAM E WILCOX, 2009).

Figura 4 - Ciclo de vida de *Ulva* sp.



Fonte: Cronodon.

Ulva sp. habita as regiões média e baixa da zona entremarés em costões rochosos, sendo encontrada também em regiões estuarinas. É uma alga oportunista que cresce e coloniza os ambientes sob condições favoráveis. Possui alta taxa de crescimento e habilidade de absorver e estocar nutrientes rapidamente, proliferando em ambientes enriquecidos com nutrientes de origem antrópica, predominando sobre outras espécies em tais ambientes (PÉREZ-MAYORGA *et al.*, 2011; LEE, 2008; GRAHAM, GRAHAM E WILCOX, 2009). Vários estudos apontam este gênero como dominante em ambientes altamente urbanizados e que recebem efluentes domésticos e industriais, sendo considerado um gênero bioindicador de qualidade das águas costeiras (STEFFENSEN, 1976; GUINDA *et al.*, 2008; MARTINS *et al.*, 2012).

De acordo com RAINBOW (1995), *U. lactuca* é uma espécie candidata a organismo biomonitor. Sua morfologia laminar, com duas camadas de células, confere-lhe grande relação superfície/volume e permite que suas células fiquem em contato com o meio externo de maneira uniforme. Sua natureza cosmopolita, tolerância a grande variedade de estresses ambientais, capacidade de sobreviver em ambientes altamente contaminados e de acumular metais sugerem sua utilização como bioindicador de contaminação por metais pesados e pesticidas (HO, 1990; MALEA E HARITONIDIS, 2000). Estudos *in situ* e *in vitro* demonstraram que *U. lactuca* e *U. rigida* C.Agardh são capazes de acumular metais, entre eles Mn, Fe, Cu, Zn, Pb, Co e Cr. (HO, 1990; HARITONIDIS E MALEA, 1999; MALEA E HARITONIDIS, 2000; LEE E WANG, 2001; PEREIRA *et al.*, 2009). Além da capacidade de bioacumulação, ensaios *in vitro* com espécies de *Ulva* demonstraram o efeito tóxico de metais pesados (Cr(VI), Tl, CuCl₂) e organo-complexos derivados, através da avaliação bioquímica (e.g., pigmentos fotossintetizantes, compostos fenólicos, geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e atividade de enzimas antioxidantes) e fisiológica (viabilidade celular, crescimento e desempenho fotossintético) (HAN *et al.*, 2008; KUMAR *et al.*, 2010; ÜNAL *et al.*, 2010; SCHIAVON *et al.*, 2012; TURNER E FURNISS, 2012).

A bioacumulação e os possíveis efeitos fitotóxicos de bifenis policlorados (PCBs), pesticidas e dos medicamentos cisplatina (antitumoral) e cloranfenicol (antibiótico) também foram estudados. Mesmo em doses baixas, o inseticida organofosforado cumafós foi promotor de estresse oxidativo em *U. pertusa*, ativando suas defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas. Apesar de ser internalizada, a cisplatina não demonstrou efeito tóxico, enquanto o cloranfenicol bioacumulou nas células e agiu como promotor do

crescimento de *U. lactuca*. A acumulação observada de PCBs foi maior em algas (e.g., *Ulva* sp.) e animais bênticos, comparativamente a espécies de peixes de níveis tróficos mais elevados. Em outro estudo, dados de bioacumulação de herbicidas em *U. rigida* foram utilizados para construção de um modelo preditivo de toxicidade, como estratégia analítica à estimativa dos efeitos poluentes daqueles agroquímicos (CARAFA *et al.*, 2009; EASTON *et al.*, 2011; NUNES *et al.*, 2011; SCHWEIKERT E BURRITT, 2012; LESTON *et al.*, 2013).

No que diz respeito aos efeitos de petróleo e derivados sobre espécies de *Ulva*, NECHEV *et al.* (2002) encontraram alterações na composição lipídica de *U. rigida* após exposição *in vitro* ao óleo diesel.

Como pode ser notado, as características ecológicas, bioquímicas e fisiológicas de *Ulva* sp., aliadas à crescente preocupação quanto ao entendimento dos efeitos nocivos de diversos xenobióticos sobre organismos marinhos, em especial às comunidades fitobentônicas, sugerem ser este gênero um dos mais adequados modelos de estudo *in situ* e *in vitro* dos impactos de poluentes em ambiente marinho.

2.4 METABOLÔMICA

Nas células, o DNA é transcrito em RNAm, o qual é traduzido em proteínas que podem catalisar reações bioquímicas dando origem a uma diversa gama de metabólitos (JAMERS *et al.*, 2009). Metabólitos são produtos finais dos processos regulatórios das células, e seus teores podem ser considerados como a resposta definitiva de sistemas biológicos às alterações genéticas e ambientais (FIEHN, 2001). Os termos 'genoma', 'transcriptoma' e 'proteoma' referem-se ao DNA total, ao conjunto de transcritos de RNAm e de proteínas de uma célula, respectivamente. De forma análoga, 'metaboloma' é o termo que designa o conjunto de metabólitos de baixo peso molecular presentes em uma célula, necessários a sua manutenção, crescimento e funcionamento normal (FIEHN, 2001; GROMSKI *et al.*, 2015). 'Metabolômica' é o campo científico que estuda o metaboloma dos organismos (BUNDY *et al.*, 2009).

O estudo do metaboloma é comparado a uma fotografia que retrata o metabolismo do organismo em um determinado instante. Para tal, a preparação da amostra deve ser feita cuidadosamente, de maneira a preservar todos os metabólitos do material biológico. Contudo, o estudo do metaboloma é uma tarefa complexa, pois os metabólitos constituem um conjunto muito diversificado de arranjos atômicos, quando comparado ao proteoma (arranjos de 20 aminoácidos) e ao transcriptoma (arranjos de 4 nucleotídeos). Isso se verifica na ampla

variação das propriedades químicas e físicas dos metabólitos, tais como peso molecular, polaridade, solubilidade e volatilidade. A diversidade de compostos é outro desafio enfrentado: a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, possui aproximadamente 600 metabólitos, comparados aos cerca de 200.000 estimados para o reino vegetal. Outro desafio imposto por esta ciência é o amplo intervalo de magnitude de concentração dos metabólitos, que pode variar de picomoles a milimoles (FIEHN, 2001; DUNN E ELLIS, 2005).

Idealmente, seria preferível identificar e quantificar todos os metabólitos utilizando uma única técnica analítica, mas isto ainda não é tecnologicamente possível devido ao alto grau de diversidade estrutural, peso molecular e diferenças de polaridade dos metabólitos primários e secundários (DUNN E ELLIS, 2005; KUMAR *et al.*, 2016). Por esta razão, diferentes técnicas e estratégias de análise têm sido utilizadas, de acordo com o objetivo da pesquisa.

Análise de metabólitos-alvo

Considera a análise qualitativa e quantitativa de um ou poucos metabólitos relacionados a uma reação metabólica específica, sendo frequentemente adotada em estudos das respostas metabólicas de um sistema biológico. Entretanto, esta abordagem analisa um número restrito de compostos, podendo limitar a interpretação dos resultados e suas aplicações na análise da genômica funcional, uma vez que eventos associados à resposta metabólica em estudo deixam de ser investigados.

Perfil de metabólitos

Visa à identificação e quantificação de diversos grupos de metabólitos, geralmente utilizando as cromatografias líquida (LC) e gasosa (GC) associadas à espectrometria de massas (MS), ou à ressonância magnética nuclear (NMR). Esta abordagem aumenta o poder de detecção e de resolução da análise, além de possibilitar a investigação concomitante de vários grupos de metabólitos, e.g., carboidratos, ácidos, álcoois, esteróis e aminoácidos.

Metabolômica

Objetiva a identificação e quantificação não tendenciosa de todos os metabólitos em um sistema biológico. A preparação da amostra não pode excluir metabólitos e o fracionamento desta é recomendado. A seletividade e a sensibilidade da técnica analítica devem ser elevadas, e as mais utilizadas são as cromatografias líquida ou gasosa acopladas à MS e a NMR. Como já mencionado, a identificação e quantificação de todos os metabólitos na amostra ainda não é factível, sendo que até

mesmo a abordagem metabolômica acaba perdendo informação de compostos-traço.

Fingerprint metabólico

Esta abordagem consiste em uma análise rápida e global, que dispensa etapas complexas de preparação das amostras e utiliza métodos analíticos mais rápidos como a MS, NMR e a FTIR. A agilidade desta abordagem permite que um número muito grande de amostras seja analisado em pouco tempo e com custo reduzido. A análise de *fingerprint* metabólico tem sido aplicada na rotina clínica para diagnóstico, controle de qualidade de produtos, análise de coleções de mutantes, entre outros (FIEHN, 2001; DUNN E ELLIS, 2005).

Independentemente do método analítico escolhido, a análise metabolômica geralmente produzirá grande quantidade de dados crus, que precisam ser arquivados, gerenciados, interpretados e integrados. Inúmeras ferramentas de bioinformática têm sido desenvolvidas para gerenciar, processar, minerar, integrar, realizar a análise estatística e até criar modelos matemáticos das redes metabólicas (KUMAR *et al.*, 2016). Previamente à análise estatística, os dados brutos precisam passar pelo pré-processamento, que envolve a redução do ruído, a correção da linha de base, o melhoramento de resolução e a normalização dos dados. A análise multivariada de dados costuma ser o método estatístico escolhido, pois consegue elucidar relações lineares e não-lineares entre as variáveis (FIEHN, 2001; FUKUSAKI E KOBAYASHI, 2005). Dentro da análise multivariada, duas famílias de métodos são frequentes nos estudos metabolômicos: a análise não-supervisionada, que engloba os agrupamentos (*clusters*), e a análise supervisionada, ou análise discriminante. A análise não-supervisionada parte de amostras desconhecidas e tenta agrupá-las pela similaridade. Na análise discriminante, inicialmente um conjunto de amostras rotuladas é utilizado pelo algoritmo estatístico como treino, para que este seja capaz de classificar corretamente novas amostras a partir das amostras conhecidas (JAIN *et al.*, 1999). Este grupo de análises é conhecido como *machine learning*, ou "aprendizado de máquina".

Dentre os métodos de análise não-supervisionada mais utilizados na metabolômica estão as análises de componentes principais (PCA), de *clusters* hierárquicos (HCA) e *k-means*, comentados a seguir por fazerem parte dos métodos utilizados neste trabalho.

A **análise de componentes principais (PCA)** é uma técnica de redução de dimensionalidade dos dados de grandes *datasets*. Nesta análise, um número menor de variáveis artificiais não-correlacionadas,

denominadas componentes principais, é criado a partir das variáveis originais, preservando praticamente toda a variância observada originalmente (AMI *et al.*, 2013). Embora esta análise não seja um algoritmo de agrupamento, ela é capaz de indicar as tendências importantes no metaboloma através de poucos componentes principais. Estas informações são dadas na forma de *loadings* e *scores*. Os *loadings* representam a contribuição de cada variável original na informação total do metaboloma, sendo útil para compreender as diferenças entre as amostras em cada variável. Os *scores* são coordenadas de vetores criados a partir dos componentes principais. O *score plot*, limitado aos componentes principais mais significativos, gera a visualização das diferenças entre as amostras de um ponto de vista geral (FUKUSAKI E KOBAYASHI, 2005).

A **análise de clusters hierárquicos** (HCA) é um método de agrupamento hierárquico baseado na distância entre cada par de dados. O método é subdividido em i) divisivo, onde uma série de partições é feita, iniciando em um único *cluster* que contém todos os objetos, até *n clusters* contendo um único objeto cada, e ii) aglomerativo, onde cada objeto inicia sozinho em seu próprio *cluster*, e estes são sequencialmente agrupados até que reste um único *cluster* com todos os objetos. Os resultados são representados em um diagrama chamado dendrograma que ilustra as fusões ou divisões realizadas em cada etapa da análise. O resultado do *cluster* é definido pela escolha de dois parâmetros: a métrica e o método de encadeamento. A métrica será utilizada para calcular a distância entre os pares de dados, e pode ser distância Euclidiana, distância Euclidiana ao quadrado, distância de Manhattan, entre outras. O método de encadeamento será utilizado para definir a distância entre os *clusters*, e pode ser completo (*complete linkage*), único (*single linkage*), médio (*average linkage*), centroide, entre outros (FUKUSAKI E KOBAYASHI, 2005).

A **análise de *k-means*** é um método de agrupamento particional, onde o algoritmo obtém uma única partição dos dados, ao invés de uma estrutura hierárquica. O algoritmo faz uma série de rodadas de análise, cada vez com um ponto de partida diferente, sendo a melhor configuração de agrupamento utilizada como resultado final da análise. O diferencial neste algoritmo é a necessidade do usuário indicar o número de *clusters* que deseja no resultado final (JAIN *et al.*, 1999).

2.4.1 Utilização da FTIR na metabolômica

Todos os compostos que possuem ligações covalentes absorvem várias frequências de radiação eletromagnética na região do

infravermelho do espectro, compreendida entre a região de comprimento de onda da luz visível e a das micro-ondas. Do ponto de vista químico, a região de interesse se concentra entre os comprimentos de onda de 2,5 a 25 μm , conhecida como região vibracional, pois é a mesma frequência em que as ligações covalentes vibram naturalmente, em movimentos de alongamento e flexão. Na química, a unidade usada para se referir a esta região do espectro eletromagnético é "número de ondas" (cm^{-1}), que é a media da quantidade de energia contida naquele comprimento de onda, e, nesta métrica, a região espectral em questão se estende de 4000 a 400 cm^{-1} . O princípio de funcionamento da espectroscopia de infravermelho médio baseia-se no fato de que as ligações químicas absorvem a radiação no infravermelho, amplificando sua vibração natural. Cada tipo de ligação (N-H, C-H, O-H, C-X, C-O, C=O, C-C, C=C, C \equiv C, C \equiv N) absorve em uma pequena e única região do espectro do infravermelho, e portanto, nenhuma molécula terá seu padrão de absorção igual ao de outra molécula, permitindo, assim, identificar as funções químicas presentes na amostra analisada (PAVIA *et al.*, 2009).

A espectroscopia de FTIR é uma técnica analítica bem estabelecida que permite a análise rápida, não-destrutiva, em larga escala, sem a necessidade de reagentes de diversos tipos de amostras. De natureza holística, esta técnica consegue analisar tanto metabólitos primários (carboidratos, aminoácidos, ácido graxos) quanto secundários (polifenóis, terpenos, alcaloides, entre outros). A rapidez e a simplicidade do método o popularizou como ferramenta à análise do *fingerprint* metabólico, descrito na sessão 2.4.1.2 (DUNN E ELLIS, 2005).

Dentro da metabolômica vegetal, o *fingerprint* obtido por FTIR já foi utilizado com sucesso para comparar a resposta metabólica de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. e da halófita *Mesembryanthemum crystallinum* L. ao estresse salino (YANG E YEN, 2002), determinar o conteúdo de carboidratos, lipídios e proteínas de biomassa de *Chlamydomonas reinhardtii* P. A. Dangeard (WAGNER *et al.*, 2010), discriminar estágios de deterioração pós-colheita de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) (UARROTA *et al.*, 2014), estudar a composição, propriedades e estrutura de polissacarídeos, ceras e demais componentes de parede celular de diversas espécies de plantas vasculares (SÉNÉ *et al.*, 1994; DUBIS *et al.*, 1999; KACURÁKOVÁ *et al.*, 2000; WILSON *et al.*, 2000) e macroalgas, dentre elas, *Ulva* spp. (ROBIC *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2009), analisar alterações quali-quantitativas na composição da parede celular de maçãs durante o desenvolvimento dos frutos (SZYMANSKA-CHARGOT *et al.*, 2015), acompanhar a dinâmica de alocação de carbono durante alterações ambientais, como

luminosidade e disponibilidade nutricional, em microalgas (WAGNER *et al.*, 2014), discriminar azeites de oliva de diferentes cultivares e regiões produtoras (GURDENIZ *et al.*, 2010; GOUVINHAS *et al.*, 2015), detectar respostas químicas decorrentes da competição interespecífica entre *Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv. e *A. thaliana* (GIDMAN *et al.*, 2003), estudar o efeito da salinidade em tomates (JOHNSON *et al.*, 2003), discriminar raízes de aveia e ervilha (NAUMANN *et al.*, 2010), discriminar espécies de Zingiberáceas (ROHAETI *et al.*, 2015), discriminar taxonomicamente exemplares das famílias Rosaceae, Apocynaceae, Liliaceae e Crassulaceae (KIM *et al.*, 2004), investigar o efeito da exposição ao Cu, Zn e Pb sobre as proteínas de tilacóides (SZALONTAI *et al.*, 1999), detectar e discriminar infecção por duas espécies de fungos em madeira (NAUMANN *et al.*, 2005), e discriminar líquens expostos à poluição do ar (CASALE *et al.*, 2015).

2.4.2 Macroalgas como objeto de estudo na metabolômica ambiental

De acordo com BUNDY *et al.* (2009), metabolômica ambiental é a aplicação da metabolômica para caracterizar as interações dos organismos com seu ambiente, abrangendo tanto a investigação de organismos obtidos diretamente do ambiente natural, quanto daqueles criados sob condições controladas de laboratório, expostos a condições ambientais simuladas. Uma das vantagens da investigação nesta área é que o foco está mais voltado a questionamentos do que a hipóteses, possibilitando descobrir relações e respostas metabólicas inesperadas, que por si só podem levar à geração de hipóteses. Por esta razão, a metabolômica tem encontrado cada vez mais espaço nas ciências ambientais, desde as respostas de organismos a estressores bióticos e abióticos naturais, até a fatores antropogênicos. Em sua revisão sobre o estado da arte, aqueles autores apontam o crescente número de trabalhos com animais terrestres e aquáticos, como minhocas, peixes e moluscos. Na área vegetal, contudo, os poucos estudos existentes investigam respostas do organismo-modelo *A. thaliana* e de algumas espécies cultiváveis como feijão, cevada e tomate a estressores abióticos, como temperatura, disponibilidade hídrica e de nutrientes.

De forma complementar, JAMERS *et al.* (2009) revisaram os avanços das ciências "ômicas" sobre as microalgas. Embora naquela época já houvesse consideráveis informações sobre a genômica destes organismos, a metabolômica ainda contava com raras publicações, concentradas na quantificação e identificação de metabólitos secundários de interesse comercial das indústrias farmacêutica,

alimentícia e de saúde. Estudos de metabolômica ambiental, de acordo com aqueles autores, eram reduzidos, com destaque ao trabalho de BÖLLING E FIEHN (2005) com *Chlamydomonas reinhardtii* sob privação de nutrientes.

Curiosamente, em uma revisão recente com foco em metabolômica de macrófitas (macroalgas e fanerógamas marinhas), KUMAR *et al.* (2016) retratam um recente avanço no sequenciamento genético e no estudo do transcriptoma de algumas espécies de macroalgas, além de um campo a ser explorado no que diz respeito à metabolômica de macroalgas. Apesar de sua bem conhecida importância ecológica, por muito tempo as macroalgas foram objeto de um extensivo perfil metabólico orientado à conhecer a composição de parede celular e compostos bioativos de interesse farmacêutico, ao passo que poucos estudos examinavam as respostas destes organismos a estressores ambientais. Entretanto, a publicação supra-referenciada cita inúmeras publicações dos últimos 10 anos, nas quais análises metabolômicas, perfil de metabólitos e análise de metabólitos-alvo foram usadas na investigação de respostas de diversas espécies de macrófitas a estressores ambientais, tais como herbivoria, infecção bacteriana, radiação UV e metais pesados. A referida revisão demonstra que a abordagem metabolômica possibilitou a identificação e o isolamento de diversos flavonoides, polifenóis e esteróis produzidos como resposta antimicrobiana, anti-herbivoria e alelopática em gramas marinhas e algas pardas. Através da metabolômica foi possível detectar flutuações na quantidade de diversos aminoácidos, açúcares, açúcares álcoois, polióis e ácidos orgânicos em *Sargassum fusiforme* (Harvey) Setchell, diferenciando exposição aguda e crônica ao cobre. Os efeitos de estresse salino e oxidativo sobre *Ectocarpus siliculosus* (Dillwyn) Lyngbye também puderam ser caracterizados pela metabolômica, tendo como principais alterações o perfil de aminoácidos, açúcares e ácidos orgânicos. No mesmo organismo, o metabolismo no ciclo claro/escuro foi investigado e os perfis de aminoácidos e ácidos orgânicos observados pôde ser associado à rota de fotorrespiração. Oxilipinas derivadas de ácidos graxos insaturados foram associadas a rotas de detoxificação em *E. siliculosus* e *Laminaria digitata* (Hudson) J. V. Lamouroux expostos ao cobre, e a mecanismos de defesa contra patógenos e herbivoria em *Condrus crispus* Stackh., *Gracilaria dura* (C. Agardh) J. Agardh e outras espécies de rodófitas. As poliaminas foram associadas a mecanismos de proteção ao estresse salino em *Grateloupia turuturu* Yamada, *U. lactuca* e *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar, à proteção do DNA e aos fosfolípídeos de membrana contra danos oxidativos em *U. lactuca* e *G. dura*, e à proteção contra radiação UV em

Pyropia cinnamomea (W. A. Nelson) W. A. Nelson e *Sargassum cymosum* C.Agardh. O perfil lipídico de ácidos insaturados também foi estudado em macroalgas de espécies como *E. siliculosus*, *L. digitata* e *Porphyra haitanensis* T. J. Chang & B. F. Zheng em resposta a estresse salino, como forma de adaptar a fluidez de membrana e manter a integridade dos complexos enzimáticos nela ancorados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA, PROCESSAMENTO E ACLIMATAÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO

Talos de *Ulva lactuca* Linnaeus foram coletados em 6 de abril de 2013, na Praia da Armação (27°44'58.5"S, 48°30'00.8"W - Figura 5), Florianópolis – SC, acondicionados em frascos plásticos contendo água do mar e transportados até o Laboratório de Biologia Celular Vegetal (LaBCeV/BEG/CCB). As algas foram lavadas em água do mar esterilizada para remoção de impurezas e limpas manualmente para a retirada de epibiontes. Para a aclimação às condições do laboratório de cultura, o material foi mantido durante 10 dias em recipientes plásticos contendo água do mar esterilizada (aproximadamente 20 g de biomassa/L de água do mar) enriquecida com a solução de von Stosch (VSES - 4 mL/L de água do mar esterilizada) (EDWARDS, 1970), sob aeração contínua, 80 μmol fótons $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de irradiância fotossinteticamente ativa ao dia (Li-cor light meter 250, United States of America, USA), temperatura ambiente de $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h.

Figura 5 - Local de coleta dos talos de *U. lactuca*. a) Imagem de satélite de Florianópolis - SC. O círculo vermelho indica a localização da Praia da Armação, na costa sudeste da Ilha de Santa Catarina, porção insular da cidade; b) Imagem de satélite da porção direita da Praia da Armação. O círculo vermelho indica a região de coleta das algas; c) Fotografia da Praia da Armação. A seta vermelha indica o ponto onde os talos foram coletados.

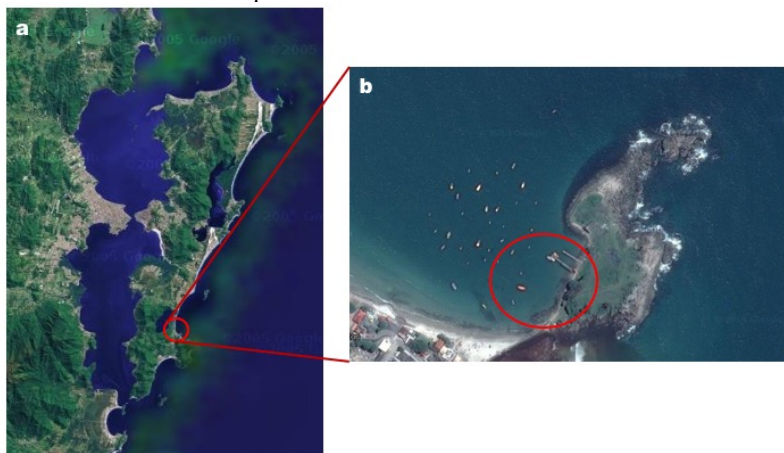


Figura 5 (Continuação)



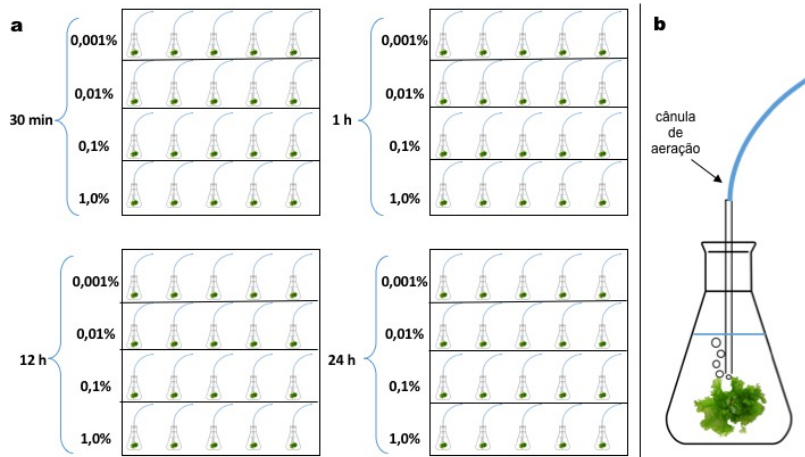
Fonte: a) Google Mapas; b) Google Mapas; c) autoria própria.

3.2 ENSAIOS DE EXPOSIÇÃO AGUDA A DERIVADOS DE PETRÓLEO

O delineamento experimental foi desenvolvido a partir de um teste-piloto (dados não mostrados) com *H. musciformis*, a primeira espécie submetida a estes ensaios e cujos resultados referentes à exposição ao óleo diesel foram publicados por RAMLOV *et al.* (2013). No teste-piloto foram identificados os intervalos de concentração de óleo diesel e de gasolina e os tempos de exposição capazes de induzir respostas bioquímicas quantificáveis (tempo de exposição e concentração mínimos) sem ocasionar a destruição dos talos (tempo de exposição e concentração máximos). Desta forma, o delineamento consistiu de uma matriz (Figura 6 a) composta por 4 tempos de exposição (30 min, 1h, 12h e 24h) combinados a 4 concentrações (0,001, 0,01, 0,1 e 1,0%; v/v) para cada combustível, totalizando 16 grupos expostos à gasolina e 16 grupos expostos ao óleo diesel.

Tanto o óleo diesel como a gasolina utilizados em todos os experimentos vieram de um mesmo lote, adquiridos em um posto Petrobras em Florianópolis - SC, a fim de evitar possíveis efeitos decorrentes da variação da composição dos combustíveis.

Figura 6 - a) Ilustração do delineamento experimental. Cada célula faz referência a um tempo de exposição (30 min, 1 h, 12 h e 24 h), enquanto as concentrações de combustíveis utilizadas (0,001%, 0,01%, 0,1% e 1,0%) são indicadas nas linhas. Cinco frascos constituíram as réplicas de cada tratamento; b) Ilustração do frasco utilizado para o ensaio contendo a cânula de aeração da água, 2 g de talos de *U. lactuca*, 400 mL de água do mar enriquecida com VSES e um tratamento com o combustível.



Fonte: autoria própria.

Para cada grupo, foram utilizadas 5 réplicas, consistindo de frascos Erlenmeyer contendo 2 g de talos de *U. lactuca* em 400 mL de água do mar esterilizada, enriquecida com VSES (conforme sessão 3.1) e o respectivo tratamento (Figura 6 b). As condições ambientais e de aeração usadas na aclimação foram mantidas durante os ensaios. Os gargalos dos frascos foram fechados com plástico filme, mas não vedados, de forma que a volatilização dos hidrocarbonetos não foi impedida. A opção por este sistema teve a intenção de simular *in vitro* um cenário mais parecido às condições de um derramamento *in loco*. As concentrações de óleo diesel e gasolina utilizados são nominais, isto é, referentes ao volume adicionado aos frascos. Não foram obtidas informações referentes à concentração dos hidrocarbonetos nas frações volátil, solúvel e insolúvel em água. O grupo controle consistiu na retirada de 10g de talos diretamente dos recipientes de cultura, alíquotamento em porções de 1g e congelamento imediato por imersão em N₂ líquido. No teste-piloto e nos ensaios que foram realizados com *H. musciformis* e *S. cymosum* var. *stenohyllum* foram utilizados talos controle (não expostos aos derivados de petróleo) para cada tempo de

exposição testado. Após ser verificada a ausência de resposta bioquímica relacionada ao tempo naqueles talos, optou-se por utilizar um grupo controle único para este delineamento, por otimizar o tempo do ensaio e os recursos disponíveis.

Após o período de exposição, uma porção (aproximadamente $1,0 \text{ cm}^2$) de talo de cada tratamento foi reservada para processamento às microscopias de luz e eletrônica. O restante das biomassas amostrais foi coletado, seco em papel toalha, aliquotado (1 g), imerso em N_2 líquido e armazenado (-80°C) até o momento das análises.

3.3 MICROSCOPIA DE LUZ E CITOQUÍMICA

O processamento das amostras foi feito de acordo com Schmidt, (2009). As amostras foram fixadas em solução de paraformaldeído 2.5 % (v/v) em tampão fosfato 0.1 M (pH 7,2), em câmara a vácuo, com incubação *overnight* à 4°C . Após a fixação, o material foi lavado em tampão fosfato (2x, 10 min) (Bouzon, 1993). Em seguida, as amostras foram desidratadas em uma série de soluções aquosas de etanol em concentrações crescentes (30%, 50%, 70%, 90% e 100%, v/v), com trocas de 15 minutos em cada concentração, à temperatura ambiente. Posteriormente, a pré-infiltração das amostras utilizou uma mistura (1: 1, v/v) de etanol e Histo-resina (Leica Histo-resin, Heidelberg, Alemanha), durante 4 h, seguido de nova infiltração em resina pura por 24 h. A inclusão em histo-moldes na mesma resina e com adição de polimerizador ocorreu à temperatura ambiente, por 2-3 h (ARNOLD *et al.*, 1975, modificado).

Secções com $5 \mu\text{m}$ de espessura foram acomodadas sobre lâminas e submetidas aos seguintes testes citoquímicos:

- **Azul de Toluidina (AT-O):** corante utilizado para identificar polissacarídeos ácidos através da reação de metacromasia. As lâminas contendo as secções foram tratadas com solução aquosa de AT-O 0,5% (m/v), acidificada com HCl 1N (pH 3,0), por 30 s, lavadas em água destilada e secas ao ar (GORDON E MCCANDLESS, 1973; MCCULLY, 1970). As lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá.

- **Azul Brilhante de Coomassie (CBB):** utilizado para detectar a presença de proteínas. As lâminas contendo as secções foram coradas (24 h) em solução etanólica acidificada de Clark contendo CBB 0,02% (m/v), lavadas sequencialmente na solução etanólica acidificada e água destilada e secas ao ar (GAHAN, 1984).

Após secagem ao livre, as lâminas foram cobertas por lamínulas, com a aplicação de bálsamo do Canadá, e observadas ao microscópio (Olympus BX 41 Epifluorescent) equipado com sistema de captura Image Q Capture Pro 5.1 Software (Qimaging Corporation, Austin, TX, Estados Unidos da América). As imagens foram analisadas visualmente, sendo a mais representativa de cada grupo utilizada para a montagem das pranchas.

3.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Amostras de talo foram incubadas *overnight* à 4°C em tampão fosfato 0,1M (pH 7,2), contendo paraformaldeído 2,5% (m/v) para fixação. Subsequentemente, foram desidratadas em série alcoólica (etanol 30%, 50%, 70%, 90% e 100%, v/v, 30 min cada troca) e secas em hexametildissilazano. As amostras foram depositadas sobre fita adesiva dupla-face de carbono em suporte de alumínio (*stubs*), metalizadas com ouro e analisadas em microscópio eletrônico de varredura a 10 kV (JSM 6390 LV - JEOL Ltd., Tokyo, Japan), junto ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC (LCME/UFSC). As imagens foram analisadas visualmente, sendo a mais representativa de cada grupo utilizada para a montagem das pranchas.

3.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

3.5.1 Dessalinização do material

Toda a biomassa utilizada nas análises bioquímicas foi previamente dessalinizada com solução de formiato de amônio 0.5 M, durante 30 segundos, seguido de enxágues (3x) com água destilada. O excesso de água foi removido da biomassa com auxílio de papel toalha.

3.5.2 Teores de clorofilas *a* e *b*

A clorofila foi dosada conforme metodologia descrita por HISCOX E ISRAELSTAM (1979), com modificações. 100 mg de massa fresca foram maceradas em nitrogênio líquido com o auxílio de cadinho e pistilo e transferidas a tubos de ensaio contendo 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Os tubos foram fechados com filme de PVC e incubados em estufa (40°C, 30 min). O extrato foi coletado e transferido (3 mL) para cubeta de vidro para leitura das absorvâncias em espectrofotômetro UV-vis (Hiatachi U-1800), em 645 e 663 nm. A

quantificação das clorofilas *a* e *b* utilizadou a fórmula de ARNON (1949), onde A refere-se ao valor de absorbância:

$$\text{mg.mL de clorofila } a = 0,0127.A_{663} - 0,00269.A_{645}$$

$$\text{mg.mL de clorofila } b = 0,0229.A_{645} - 0,00468.A_{663}$$

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em µg de clorofila por g de massa fresca.

3.5.3 Perfil de carotenoides

Os carotenoides foram extraídos de 1 g de massa fresca em 10 mL de solução hexano: acetona (1: 1, v/v) contendo *tert*-butil-hidroxitolueno (BHT) 0,001% (m/v), durante 1 h (RAMLOV *et al.*, 2013). Os extratos foram filtrados e o solvente foi evaporado sob fluxo de N₂. Para melhorar a identificação dos analitos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), foi realizada a saponificação dos carotenoides previamente à análise cromatográfica da seguinte forma: o resíduo seco foi solubilizado em 3 mL de hexano, seguido da adição (100 µL mL⁻¹) de solução de 10% de KOH em metanol ao extrato e incubação durante 3 h, no escuro, à temperatura ambiente. A solução foi lavada (3x) com água destilada deionizada e o extrato não-esterificado coletado, concentrado em fluxo de N₂ e ressolubilizado em hexano (100 µL) para as análises cromatográficas (RAMLOV *et al.*, 2013).

As amostras (10 µL, n=3) foram injetadas em cromatógrafo líquido (Shimadzu LC-10A) equipado com uma coluna de fase reversa C18 (Vydac 218TP54; 250 mm x 4.6 mm Ø, 5 µm, 30°C), protegida por uma coluna-guarda de fase reversa (Vydac 218GK54) e um detector UV-visível (450 nm). A eluição foi realizada com MeOH: CH₃CN (90: 10, v/v) a um fluxo de 1 mL min⁻¹. A identificação dos analitos de interesse (α-caroteno, β-caroteno, luteína, zeaxantina, e β-criptoxantina) foi realizada usando os tempos de retenção e co-cromatografia de compostos-padrão (Sigma-Aldrich, USA) e também por analogia com outros relatos de análise de carotenoides sob condições similares (SCOTT AND ELDRIDGE, 2005; HULSHOF *et al.*, 2007). A concentração de carotenoides foi calculada com base na curva-padrão externa de luteína (0,5–45 µg mL⁻¹; y = 7044x; r²=0,999), para luteína, zeaxantina, e β-criptoxantina, e na curva-padrão externa de β-caroteno (0,01–12 µg L⁻¹; y=1019x; r²=0,998), para α- e β-caroteno.

3.5.4 Quantificação de polifenóis

O extrato utilizado à determinação dos conteúdos totais de compostos fenólicos foi obtido com a maceração em nitrogênio líquido de 1 g de massa fresca, com o auxílio de cadinho e pistilo, e 10 mL de metanol 80% (v/v). O cadinho foi coberto com plástico filme e papel alumínio e incubado à temperatura ambiente durante 1 hora. Após esse período, o extrato foi filtrado a vácuo e utilizado na análise subsequente.

A determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais adotou metodologia descrita por SCHIAVON *et al.* (2012), com modificações. 100 μL de extrato foram incubados com 75 μL de reativo de Folin-Ciocalteu e 825 μL de carbonato de sódio 2% (m/v) durante 1 hora, no escuro. Após esse tempo, a absorbância (750 nm) do meio de reação foi determinada em leitor de ELISA e a quantificação dos compostos fenólicos totais calculada via curva padrão de ácido gálico (5 a 750 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ – $y = 0,0044x$, $r^2 = 0,99$). As leituras foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em μg de ácido gálico por g de massa fresca.

3.5.5 Açúcares solúveis e amido

Estas variáveis foram determinadas segundo o método de UMBREIT E BURRIS (1964). Para tal, em 50 mg de massa fresca, previamente macerada em N_2 líquido, foram adicionados 2 mL de solução MCW (metanol: clorofórmio: água, 12: 5: 3, v/v/v) em tubos Falcon e centrifugados (4000g, 10 min). O sobrenadante foi coletado e reservado em outro tubo Falcon, seguido de re-extração do *pellet*. Os extratos foram reunidos, o volume final ajustado para 4 mL com MCW, seguido da adição de 1,5 mL de água destilada e 1 mL de clorofórmio. Os extratos foram centrifugados (4000g, 5 min), resultando em meio bifásico. Para quantificação dos açúcares solúveis, 1 mL da fração superior dos extratos foi coletada e adicionada de 2 mL do reagente de antrona 0,2% (m/v) em ácido sulfúrico (p.a.). Os tubos foram fechados, agitados em vórtex e incubados em banho-maria (100°C, 3 min). A absorbância dos extratos foi lida em 630 nm em leitor de ELISA. As extrações foram feitas em triplicatas e cada réplica foi plaqueada em dois poços, gerando um total de 6 leituras para cada tratamento. A quantificação de açúcares solúveis foi feita a partir de curva-padrão de glucose (10 a 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ - $y = 0,0088x$, $r^2 = 0,99$) e os resultados expressos em μg de glucose por g de massa fresca.

A extração de amido utilizou o *pellet* gerado durante a extração de açúcares solúveis. Foram adicionados 2 mL de ácido perclórico 30%

(v/v) ao *pellet*, seguido de centrifugação (4000g, 10 min) e coleta do sobrenadante. O *pellet* foi re-extraído e o sobrenadante adicionado ao extrato anteriormente obtido para a quantificação do amido (UMBREIT E BURRIS, 1964). Para quantificação daquele polissacarídeo, 1 mL dos extratos foi coletado e adicionado de 2 mL do reagente de antrona 0,2% em ácido sulfúrico (p.a., m/v). Os tubos foram fechados, agitados em vórtex e incubados em banho-maria (100°C, 3 min). A absorbância dos extratos foi lida em 630 nm em leitor de ELISA. As extrações foram feitas em triplicatas e cada réplica foi plaqueada em dois poços, gerando um total de 6 leituras para cada tratamento. A quantificação de amido foi feita a partir de curva-padrão de amido (0,5 a 5 mg.mL⁻¹ - $y = 0,3411x$, $r^2 = 0,99$) e os resultados expressos em mg de amido por g de massa fresca.

3.5.6 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas apenas sobre os dados bioquímicos. Os dados do grupo controle e dos grupos tratados foram analisados por análise de variância (ANOVA) unifatorial seguida do teste Tukey para a comparação de médias. ANOVA multifatorial foi realizada para verificar a contribuição individual e combinada dos fatores tempo de exposição e concentração na variância dos resultados. O teste de correlação de Pearson foi realizado para investigar a existência de correlação entre os conteúdos de clorofilas *a* e *b* e os conteúdos dos metabólitos e os fatores testados. Todos os testes foram realizados considerando o limite de confiança de 95% ($p \leq 0,05$). Para verificar se o conjunto de variáveis bioquímicas analisadas poderia caracterizar os grupos de acordo com os fatores em estudo, os dados foram normalizados, seguido do cálculo dos componentes principais (PCA) e análise de *clustering* hierárquico (HCA). A HCA utilizou a distância euclidiana para o cálculo da distância entre os pontos e o método de encadeamento completo para definir os agrupamentos. Todas as análises estatísticas e gráficos foram realizados utilizando *scripts* em linguagem R (v. 3.1.1), empregando ferramentas desenvolvidas em colaboração com o grupo BIOSYSTEMS, da Universidade do Minho (Portugal) (encontradas no *package* "specmine", disponível gratuitamente no CRAN), além de funções dos *packages* "devtools" (WICKHAM E CHANG, 2015), "agricolae" (MENDIBURU, 2014), e "ggplot2" (WICKHAM, 2009).

3.6 METABOLÔMICA

3.6.1 Espectroscopia de infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR)

0,5 - 1,0 mg de biomassa liofilizada e KBr foram utilizados para a confecção de pastilhas usadas na aquisição dos espectros. Os espectros foram obtidos por um espectrômetro com transformada de Fourier FTLA2000 ABB Bomem equipado com acessório de reflectância total atenuada (ATR). Um espectro de fundo com KBr puro foi obtido como linha de base. Os espectros foram adquiridos em modo de transmitância, no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 2.04 cm^{-1} , totalizando 1765 pontos. 128 varreduras co-adicionadas antes da transformada de Fourier foram coletadas para cada espectro e 5 espectros de cada amostra foram obtidos.

3.6.2 Estrutura dos dados, pré-processamento e análise

Três *datasets* foram usados nas análises: i) *dataset* completo, com os espectros da amostra controle, das amostras expostas ao óleo diesel e das amostras expostas à gasolina (165 espectros); ii) *dataset* óleo diesel, com os espectros da amostra controle e das amostras expostas aquele derivado de petróleo (85 espectros); iii) *dataset* gasolina, com os espectros da amostra controle e das amostras expostas à gasolina (85 espectros).

Todo o pré-processamento, análises multivariadas e gráficos foram realizados usando *scripts* escritos em linguagem R (v. 3.2.3), empregando ferramentas do *package* "specmine", citado na sessão 3.5.6.

3.6.2.1 Pré-processamento dos espectros

Os espectros de FTIR foram inicialmente convertidos de transmitância para absorbância. Na sequência, combinações de métodos de normalização, correção de linha de base, suavização dos picos (*smoothing*) e derivadas disponíveis no *package* "specmine" foram testadas na análise de componentes principais (PCA) e de clusters hierárquicos (HCA). Foram selecionadas as combinações de etapas de pré-processamento que geraram os agrupamentos mais satisfatórios na PCA e/ou na HCA. Para o *dataset* completo, a combinação utilizada foi normalização dos dados utilizando a mediana, seguido de correção de linha de base com o método *Modified Polynomial Fitting* (MPF). Para os *datasets* gasolina e óleo diesel, foi utilizada apenas a correção de

linha de base com o método dos *Asymmetric Least Squares* (ALS), dispensando etapas adicionais.

3.6.2.2 Análise de dados

A análise dos espectros foi realizada considerando todo o intervalo espectral coletado ($4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$), e as regiões de absorvância características de proteínas ($1700\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$), lipídios ($3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$), carboidratos ($1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$) e a região de *fingerprint* ($800\text{-}500\text{ cm}^{-1}$) (PISTORIUS *et al.*, 2009). Sobre estes conjuntos de dados, foram realizadas as análises de Componentes Principais (PCA), *k-means* e *clusters* hierárquicos (HCA), na qual foi utilizado o cálculo da distância euclideana entre os pontos e o método do encadeamento completo para os agrupamentos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXPOSIÇÃO À GASOLINA

Os resultados referentes à bioquímica e ultraestrutura de *U. lactuca* exposta à gasolina foram publicados em 2016, na edição 156 do periódico *Chemosphere* (Elsevier), classificado como A2 na área Ciências Biológicas I do Qualis CAPES 2014, sob o título "*In vitro* exposure of *Ulva lactuca* Linnaeus (Chlorophyta) to gasoline – Biochemical and morphological alterations" (doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.04.126), com co-autoria de Dr.^a Fernanda Ramlov, Dr. Eder Carlos Schmidt, Marianne Kreusch, Débora Tomazi Pereira, Christopher Costa, Eva Regina de Oliveira, Cláudia M. Bauer, Prof. Dr. Miguel Rocha, Prof.^a Dr.^a Zenilda Laurita Bouzon, Prof. Dr. Marcelo Maraschin.

4.1.1 Citoquímica e microscopia eletrônica de varredura

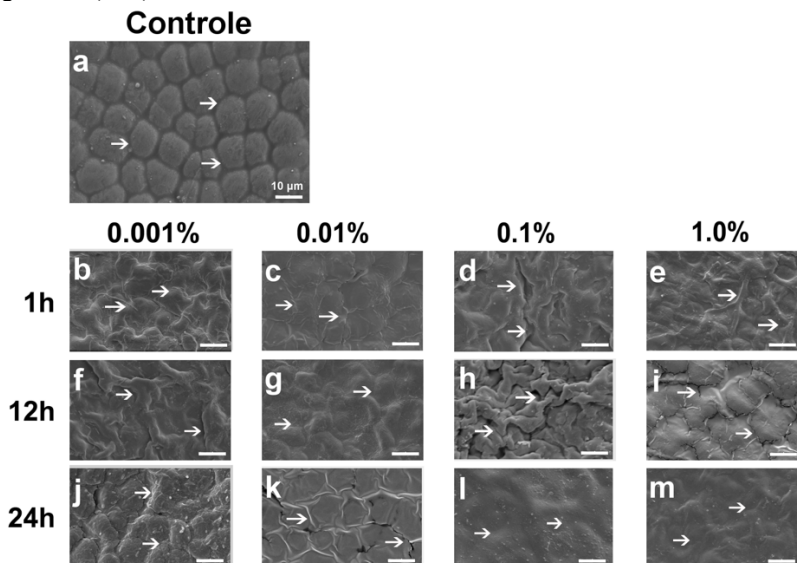
Talos de *U. lactuca* expostos à gasolina apresentaram alterações morfológicas e ultraestruturais perceptíveis desde a primeira hora de exposição. Através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) observou-se que a superfície dos talos do grupo controle (Figura 7 a) exibiu o contorno da parece celular bem definido e citoplasmas túrgidos. Este perfil foi perdido após a exposição dos talos à gasolina (Figura 7 b-m). O contorno das células não mais pode ser distinguido e a mucilagem assumiu aspecto rugoso (Figura 7 b, d, f, g, h, i, j), ou liso (Figura 7 c, l, m), embora tais alterações não pareçam estar relacionadas especificamente ao tempo de exposição ou à concentração de gasolina.

O corante azul de toluidina (AT-O) é utilizado para marcação de polissacarídeos ácidos, como os que compõem a parede celular de *U. lactuca*, pois a reação metacromática que ocorre entre o corante e os grupamentos sulfato dos carboidratos da parede celular gera intensa coloração violeta. Além de corar a parede celular do material analisado (Figura 8), a marcação com AT-O evidenciou a presença de grande quantidade de grânulos metacromáticos espalhados uniformemente pelo citoplasma das células do grupo controle (Figura 8 a) e nos grupos expostos à gasolina (Figura 8 b-m).

A citoquímica com azul brilhante de Coomassie (CBB) é utilizada para identificar proteínas, presentes em grande quantidade tanto em membranas quanto solubilizadas no citoplasma. Por esta razão, as células de *U. lactuca* observadas na Figura 9 apresentam coloração azul em diversas intensidades, relacionadas à concentração proteica das

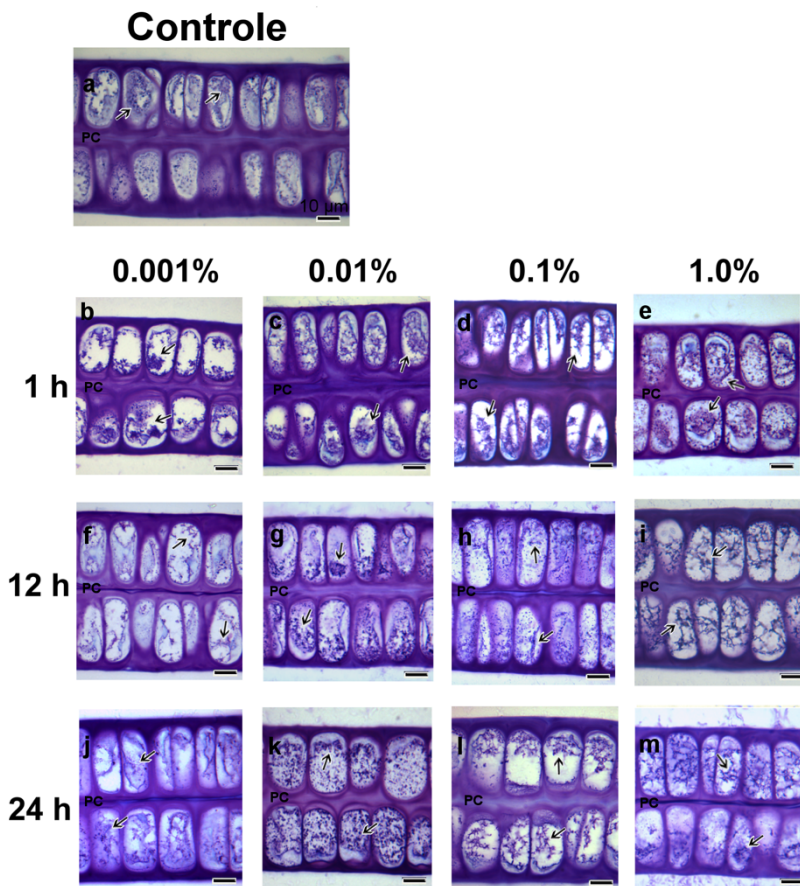
estruturas coradas. A tonalidade mais intensa, indicando maior concentração proteica, foi observada na parte externa da parede celular e no citoplasma. Vacúolo e parede celular apresentaram coloração com menor intensidade. Nas células do talo do grupo controle (Figura 9 a) foi possível perceber que o citoplasma se distribuiu de maneira uniforme em torno do vacúolo, enquanto nas células expostas à gasolina este mostrou-se com aspecto aglutinado (Figura 9 b-m). Este efeito foi mais intenso nos grupos expostos à 0,1 e 1,0% de gasolina durante 12h e 24h.

Figura 7 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da superfície dos talos de *U. lactuca* do grupo controle (a) e grupos expostos à gasolina (b-m). As setas indicam o contorno da parede celular e citoplasma túrgido no grupo controle (a) e rugosidades, rachaduras e alisamento da superfície dos talos expostos à gasolina (b-m).



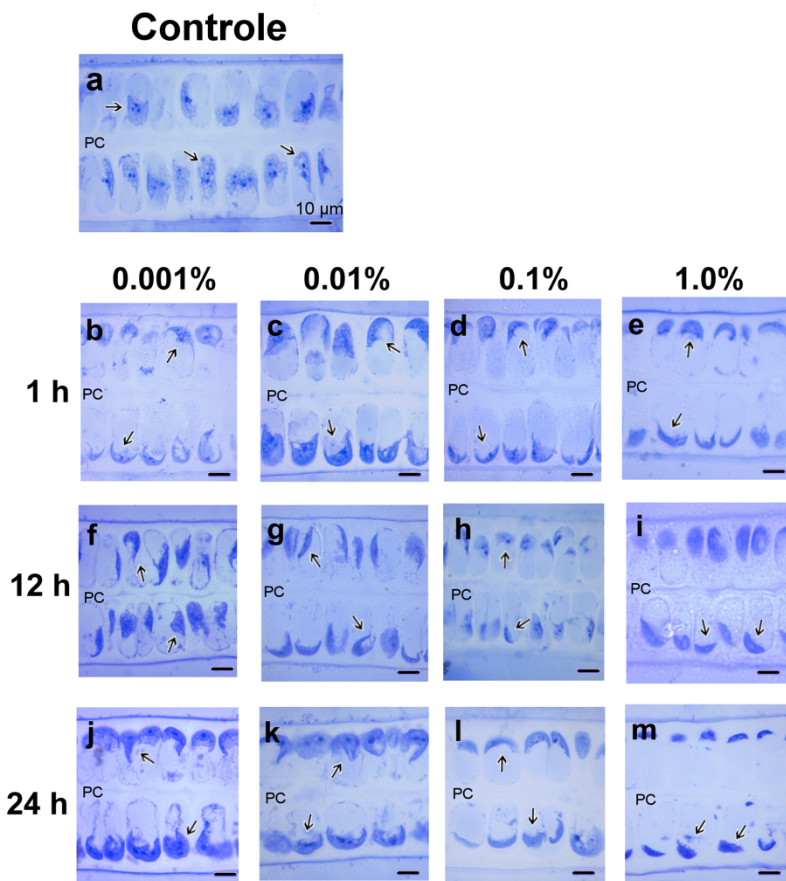
Fonte: autoria própria.

Figura 8 - Microscopia de luz de secções transversais da dupla camada de células dos talos de *U. lactuca* do grupo controle e dos grupos expostos à gasolina, corados com AT-O. PC = parede celular. As setas indicam pequenos grânulos metacromáticos homogeneamente espalhados em citoplasma regular (a) e aglomerados metacromáticos em citoplasma retraído (b-m). Barras de escala = 10 μ m.



Fonte: autoria própria.

Figura 9 - Microscopia de luz de secções transversais da dupla camada de células dos talos de *U. lactuca* do grupo controle e dos grupos expostos à gasolina, corados com CBB. PC = parede celular. As setas indicam citoplasma bem distribuído ao redor do vacúolo (a) e citoplasma deformado, aglutinado (b-m). Barras de escala = 10 μ m.



Fonte: autoria própria.

4.1.2 Análise bioquímica

Os conteúdos de clorofila *a* e *b*, sua soma (clorofilas totais), carotenoides totais, polifenóis, açúcares solúveis e amido dos grupos em estudo estão plotados nas Figuras 10 - 14 e discriminados no Apêndice A, juntamente com os respectivos desvios padrão e resultados da análise de variância de uma via (ANOVA). Os resultados do teste de correlação de Pearson são mostrados na Tabela 1, enquanto aqueles da análise de variância multifatorial (MANOVA) podem ser conferidos na Tabela 2. O perfil carotenóidico das amostras está discriminado no Apêndice B. A Tabela 3 mostra a proporção de variância em cada componente principal. As Figuras 15 e 16 trazem os resultados de PCA e HCA, respectivamente. Para dar fluidez ao texto e facilitar a consulta às figuras e tabelas, as mesmas encontram-se no final desta sessão.

Os valores de clorofilas *a*, *b* e clorofilas totais (Figura 10) foram significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) entre praticamente todos os grupos (Apêndice A). O teste de Pearson indicou que os valores de clorofila *a* e *b* são fortemente correlacionados ($r=0,99$, $p \leq 0,05$). Por esta razão, as análises subsequentes foram realizadas apenas com os conteúdos de clorofilas totais. Não foi observada correlação significativa ($p \leq 0,05$) entre os conteúdos de clorofilas totais e o tempo de exposição ou a concentração de gasolina (Tabela 1). Cada um destes fatores explicou cerca de 10% da variância observada, porém sua combinação, explicou aproximadamente 75% dos valores encontrados para clorofilas totais (Tabela 2).

No perfil carotenóidico (Apêndice B), foram identificados luteína, β -criptoxantina, α -caroteno, *trans*- β -caroteno, e *cis*- β -caroteno em todas as amostras. Um composto não identificado, com tempo de retenção de 3,3-3,5 min, não foi encontrado nos talos expostos a 0,01% e 0,1% de gasolina por 30 min. Nos talos expostos a 0,001%, 0,01% e 0,1% de gasolina por 1 h não foi detectada a presença de zeaxantina. Além disso, este carotenoide parece ser o mais sensível à exposição à gasolina, pois, nos grupos em que foi detectado, seu conteúdo foi inferior ao observado no grupo controle. Os conteúdos de β -criptoxantina e luteína mostraram redução a partir de 1 h e 12h de exposição, respectivamente. Os carotenos tiveram incremento após 30 min de exposição, mas após 12 h, os teores de β -carotenos apresentaram redução. O conteúdo de carotenoides totais (Figura 11) apresentou correlação negativa significativa ($p \leq 0,05$) com o tempo de exposição à gasolina (Tabela 1). Este fator explicou 60% da variância observada nos

conteúdos destes pigmentos, enquanto a combinação com o fator concentração conseguiu explicar 91% da variância dos dados (Tabela 2).

Houve redução no conteúdo de polifenóis (Figura 12) a partir de 30 min de exposição à gasolina (Apêndice A), sendo negativa ($p \leq 0,05$) a correlação desta variável com o tempo de exposição ao xenobiótico (Tabela 1). Este fator explicou 48% da variância observada e, combinado ao fator concentração permitiu ampliar a 93% da variância dos dados amostrais (Tabela 2).

A quantidade de açúcares solúveis (Figura 13) aumentou significativamente ($p \leq 0,05$) ao longo do tempo de exposição (Apêndice A), estando positivamente correlacionada a este fator (Tabela 1). Isoladamente, o fator tempo de exposição foi responsável por 71% da variância dos dados, e combinado ao fator concentração permitiu explicar 90% da variância (Tabela 2).

O conteúdo de amido (Figura 14) apresentou comportamento similar ao de açúcares solúveis, aumentando ao longo do período de exposição à gasolina (Apêndice A). Este metabólito também apresentou correlação positiva com o fator tempo de exposição (Tabela 1), que explicou, sozinho, 90% da variância dos dados (Tabela 2).

A análise de componentes principais (PCA) (Tabela 3) revelou que PC1 acumulou 54% da variância dos dados, sendo este valor ampliado com PC2 a 77% da variância. No gráfico de *plot dos scores* de PC1 com PC2 (Figura 15), é possível perceber que os grupos expostos à gasolina durante 30 min (T1) situam-se em PC1 positivo, o grupo controle e os grupos expostos durante 1 h (T2) e 12 h (T3) estão próximos ao eixo de PC1, enquanto aqueles e os grupos expostos por durante 24 h (T4) ocorreram estão em PC1 negativo. Os vetores, representando as contribuições fatoriais (os *loadings*) das variáveis originais, indicam que os teores de clorofilas totais, carotenoides totais e polifenóis possuem contribuição maior em PC1 positivo, enquanto os valores de que açúcares solúveis e amido possuem maior contribuição apresentaram em PC1 negativo. À exceção dos carotenoides, que possuem contribuição em PC2 positivo, as demais variáveis possuem contribuição em PC2 negativo.

Assim como foi observado nas análises univariadas e na PCA, o tempo de exposição mostrou-se determinante no resultado da análise de *clusters* hierárquicos. Através do dendrograma (Figura 16) é possível observar a discriminação dos grupos de tratamentos de acordo com o tempo de exposição à gasolina.

Tabela 1 – Coeficientes de correlação de Pearson entre os fatores tempo de concentração e concentração e os conteúdos de clorofilas totais, carotenoides totais, polifenóis, açúcares solúveis e amido de *U. lactuca* não exposta (controle) e exposta à gasolina (0.001-1%, v/v) por 30 min, 1 h, 12 h, e 24 h. (*) indica $p \leq 0.05$; (***) indica $p \leq 0.01$.

	Tempo de exposição	Concentração
Clorofilas totais	-0,31	-0,18
Carotenoides	-0,65 ***	-0,03
Polifenóis	-0,51 *	-0,08
Açúcares solúveis	0,75 ***	0,09
Amido	0,95 ***	0,08

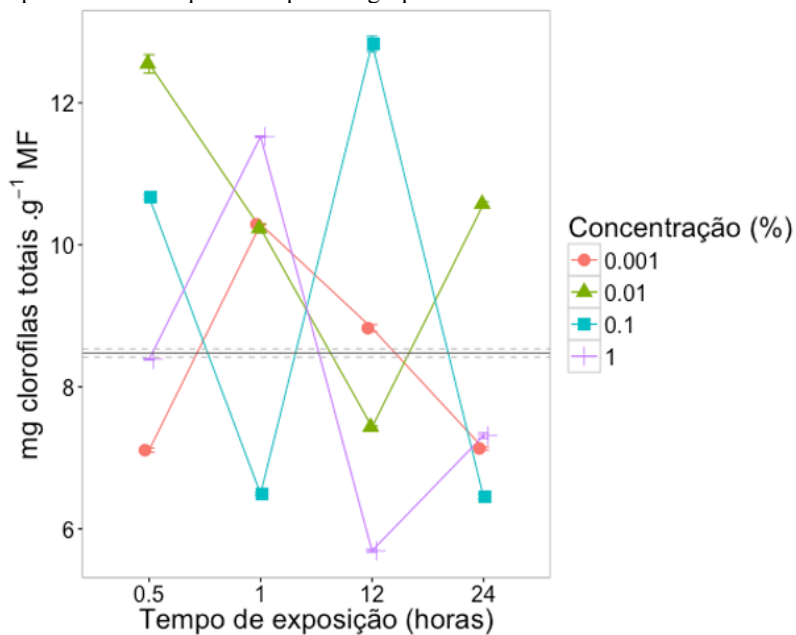
Fonte: autoria própria.

Tabela 2 - Análise de variância multifatorial (MANOVA) para os dados de realizada nos conteúdos de clorofilas totais, carotenoides totais, polifenóis, açúcares solúveis e amido de *U. lactuca*, considerando o efeito do tempo de exposição e da concentração de gasolina, separados e combinados. Intervalo de confiança de 95% foi considerado ($p \leq 0.05$).

	Tempo de exposição	Concentração	Tempo de exposição: concentração	Resíduos
	<i>Variância explicada</i>			
Clorofilas totais	0,116	0,125	0,758	0,000
Carotenoides	0,606	0,034	0,316	0,044
Polifenóis	0,488	0,047	0,451	0,015
Açúcares solúveis	0,714	0,041	0,185	0,060
Amido	0,906	0,019	0,049	0,027
	<i>valores de p</i>			
Clorofilas totais	1,228E-41	8,850E-43	2,754E-53	
Carotenoides	2,383E-19	1,887E-04	5,773E-13	
Polifenóis	1,256E-24	3,278E-10	5,670E-22	
Açúcares solúveis	9,464E-17	9,390E-04	2,697E-07	
Amido	5,360E-25	4,844E-04	2,061E-05	

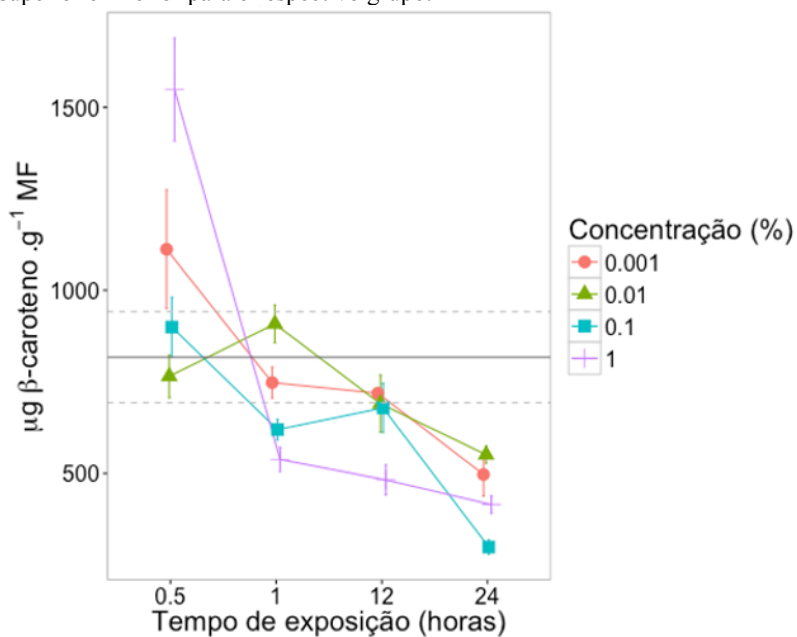
Fonte: autoria própria.

Figura 10 - Conteúdos de clorofilas totais de talos de *U. lactuca*. O grupo controle está representado pela linha escura horizontal contínua, enquanto os desvios padrão (DP) superior e inferior estão representados pelas linhas horizontais pontilhadas. Os grupos expostos à gasolina estão representados pelos pontos, de acordo com o tempo de exposição (eixo X) e concentração (formato do ponto). As linhas verticais em cada ponto representam os DP superior e inferior para o respectivo grupo.



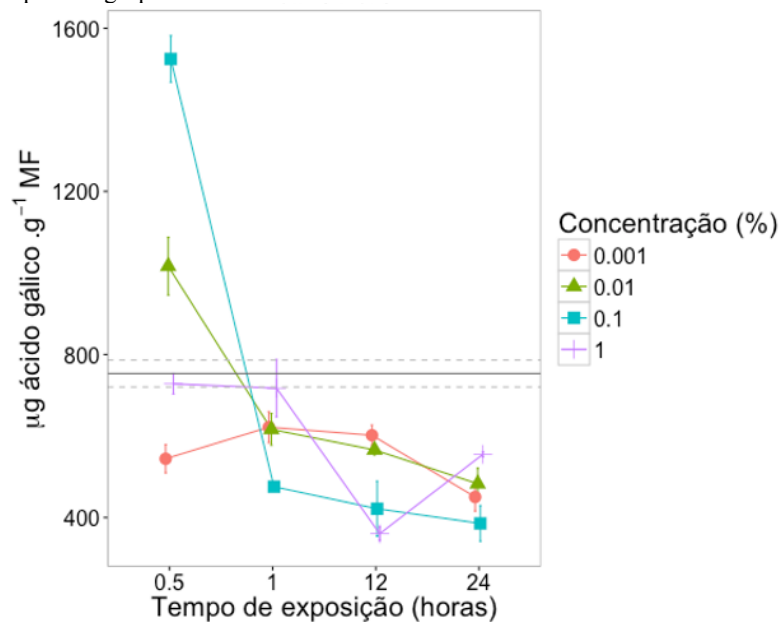
Fonte: autoria própria.

Figura 11 - Conteúdos de carotenoides totais de talos de *U. lactuca*. O grupo controle está representado pela linha escura horizontal contínua, enquanto os desvios padrão (DP) superior e inferior estão representados pelas linhas horizontais pontilhadas. Os grupos expostos à gasolina estão representados pelos pontos, de acordo com o tempo de exposição (eixo X) e concentração (formato do ponto). As linhas verticais em cada ponto representam os DP superior e inferior para o respectivo grupo.



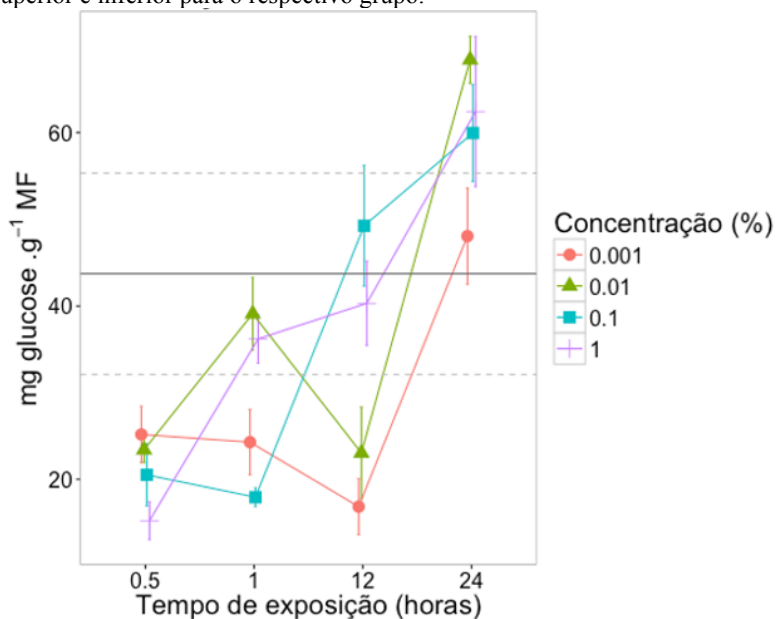
Fonte: autoria própria.

Figura 12 - Conteúdos de polifenóis de talos de *U. lactuca*. O grupo controle está representado pela linha escura horizontal contínua, enquanto os desvios padrão (DP) superior e inferior estão representados pelas linhas horizontais pontilhadas. Os grupos expostos à gasolina estão representados pelos pontos, de acordo com o tempo de exposição (eixo X) e concentração (formato do ponto). As linhas verticais em cada ponto representam os DP superior e inferior para o respectivo grupo.



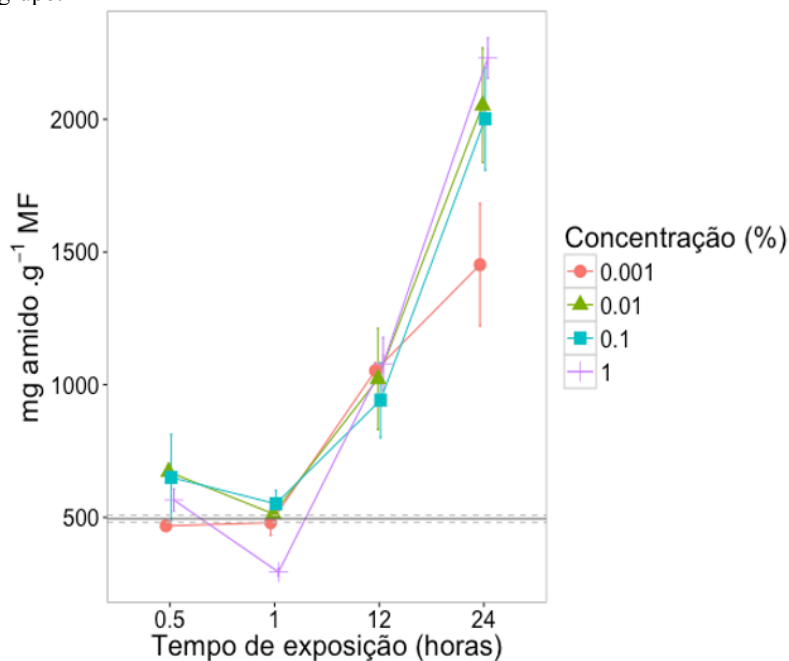
Fonte: autoria própria.

Figura 13 - Conteúdos de açúcares solúveis de talos de *U. lactuca*. O grupo controle está representado pela linha escura horizontal contínua, enquanto os desvios padrão (DP) superior e inferior estão representados pelas linhas horizontais pontilhadas. Os grupos expostos à gasolina estão representados pelos pontos, de acordo com o tempo de exposição (eixo X) e concentração (formato do ponto). As linhas verticais em cada ponto representam os DP superior e inferior para o respectivo grupo.



Fonte: autoria própria.

Figura 14 - Conteúdos de amido de talos de *U. lactuca*. O grupo controle está representado pela linha escura horizontal contínua, enquanto os desvios padrão (DP) superior e inferior estão representados pelas linhas horizontais pontilhadas. Os grupos expostos à gasolina estão representados pelos pontos, de acordo com o tempo de exposição (eixo X) e concentração (formato do ponto). As linhas verticais em cada ponto representam os DP superior e inferior para o respectivo grupo.



Fonte: autoria própria.

Tabela 3 - Análise de componentes principais (PCA) aplicada aos dados de clorofilas totais, carotenoides totais, polifenóis, açúcares solúveis e amido de *U. lactuca* não exposta (controle) e exposta à gasolina (0.001-1%, v/v) por 30 min, 1 h, 12 h, e 24 h.

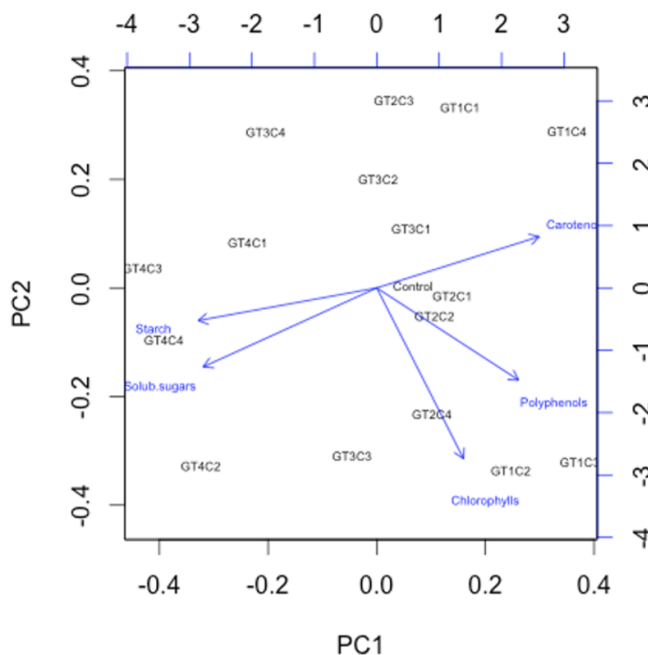
Contribuição de

componentes principais:

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
Desvio padrão	1,655	1,060	0,731	0,663	0,406
Proporção da variância	0,548	0,225	0,107	0,088	0,033
Proporção acumulada	0,548	0,772	0,879	0,967	1,000

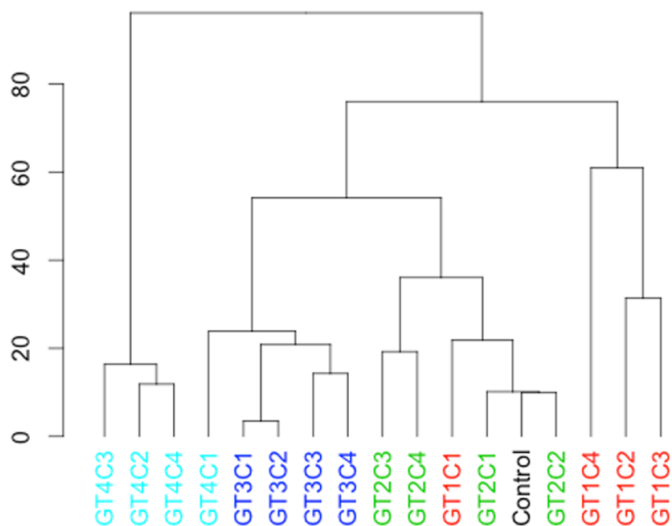
Fonte: autoria própria.

Figura 15 - PCA das variáveis bioquímicas dos talos de *U. lactuca* do grupo controle e dos grupos expostos à gasolina. Legenda dos grupos: G=gasolina; Tempo de exposição: T1 = 30min, T2 = 1h, T3 = 12h, T4 = 24h; Concentração de gasolina: C1 = 0.001%; C2 = 0.01%; C3 = 0.1%; C4 = 1.0%.



Fonte: autoria própria.

Figura 16 - Dendrograma da HCA das variáveis bioquímicas dos talos de *U. lactuca* do grupo controle e dos grupos expostos à gasolina. Legenda dos grupos: G=gasolina; Tempo de exposição: T1 = 30min, T2 = 1h, T3 = 12h, T4 = 24h; Concentração de gasolina: C1 = 0.001%; C2 = 0.01%; C3 = 0.1%; C4 = 1.0%. Cores das folhas indicadas na legenda da figura, de acordo com o tempo de exposição à gasolina.



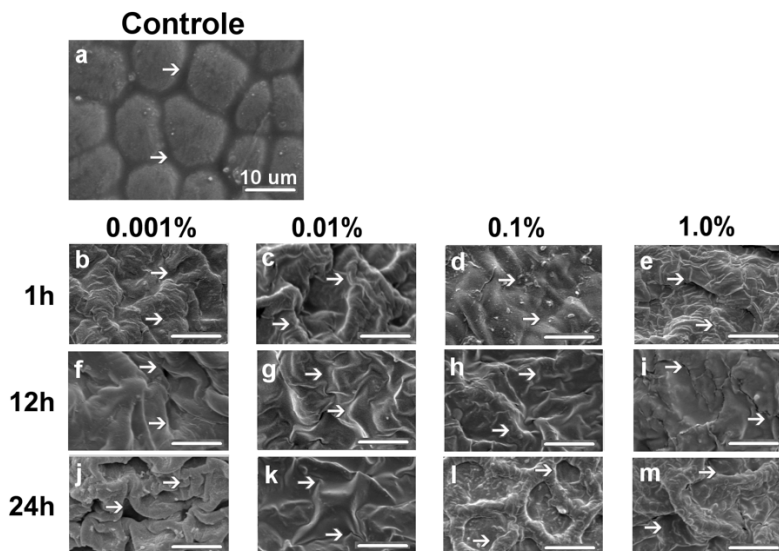
Fonte: autoria própria.

4.2 EXPOSIÇÃO AO ÓLEO DIESEL

4.2.1 Citoquímica e microscopia eletrônica de varredura

A exposição de *U. lactuca* ao óleo diesel provocou alterações morfológicas perceptíveis já na primeira hora de exposição, mesmo nas menores concentrações investigadas. A MEV evidenciou alteração intensa da mucilagem do talo. O aspecto túrgido e o contorno bem definido das células observados no grupo controle foram substituídos pelo aspecto rugoso dos grupos expostos ao diesel (Figura 17).

Figura 17 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da superfície dos talos de *U. lactuca* do grupo controle (a) e dos grupos expostos ao óleo diesel (b-m). As setas indicam o contorno da parede celular e citoplasma túrgido no grupo controle (a) e rugosidades, rachaduras e alisamento da superfície dos talos expostos ao óleo diesel (b-m).

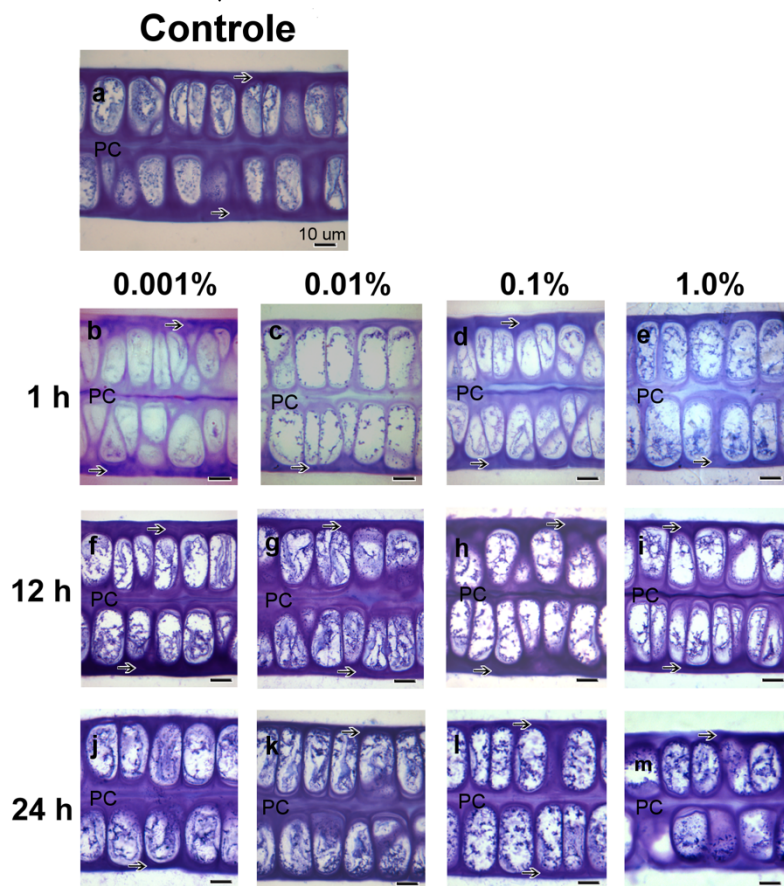


Fonte: autoria própria.

A coloração das amostras com AT-O revelou o espessamento da parede celular de *U. lactuca* principalmente após 12 h de exposição ao óleo diesel, porém também visível após 1 h para as concentrações de 0,001% e 0,1%, comparativamente ao grupo controle (Figura 18). Esse aumento foi menos evidente após 1 h para as concentrações de 0,01% e 1,0%. Após 24 h de exposição ao xenobiótico a parede celular

apresentou uma aparente e pequena redução de espessamento com relação ao grupo controle. Neste caso, o tempo prolongado de exposição pode ter causado danos relevantes à parede celular. Também foi evidente a redução do volume citoplasmático após a exposição aquele xenobiótico, indicando alteração no equilíbrio osmótico celular.

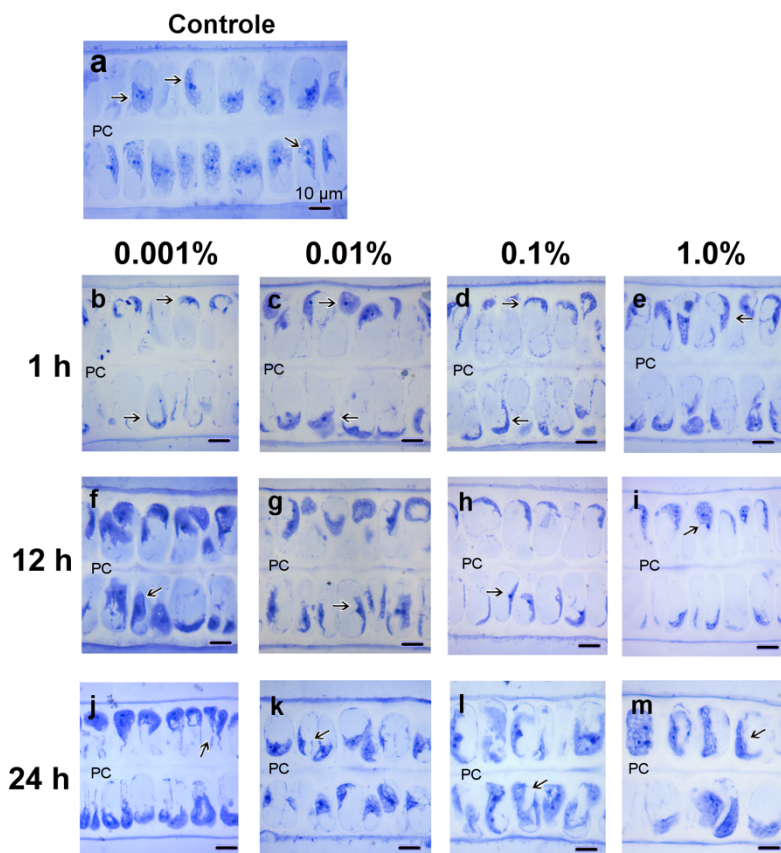
Figura 18 - Microscopia de luz de secções transversais da dupla camada de células dos talos de *U. lactuca* do grupo controle e dos grupos expostos ao óleo diesel, corados com AT-O. PC = parede celular entre as duas camadas de células. As setas indicam a parede celular em contato com o meio externo. Barras de escala = 10 μ m.



Fonte: autoria própria.

O CBB revelou organelas bem distribuídas no citoplasma das células do grupo controle, incluindo o cloroplasto (Figura 19a). Houve alterações na morfologia da porção proteica após 30 min de exposição ao óleo diesel (Figura 19b-e), que mostrou-se aglutinada na região apical das células. No entanto, a morfologia desta mostrou-se normal após os tempos mais longos de exposição (Figuras 19f-m), sugerindo que as células recuperaram-se do dano ao longo deste período.

Figura 19 - Microscopia de luz de secções transversais da dupla camada de células dos talos de *U. lactuca* do grupo controle e dos grupos expostos ao óleo diesel, corados com CBB. PC = parede celular. As setas indicam citoplasma bem distribuído ao redor do vacúolo (a) e alterado após exposição ao óleo diesel (b-m). Barras de escala = 10 μ m.



Fonte: autoria própria.

4.2.2 Análise bioquímica

Os conteúdos de clorofila *a*, *b*, clorofilas totais, carotenoides totais, polifenóis, açúcares solúveis e amido dos grupos em estudo são mostrados nas Figuras 20 - 24 e discriminados no Apêndice C, juntamente com os respectivos desvios padrão e resultados da análise de variância de uma via (ANOVA). Os resultados do teste de correlação de Pearson e de análise de variância multifatorial (MANOVA) são apresentados nas Tabela 4 e 5, respectivamente. O perfil carotenóidico das amostras está discriminado no Apêndice D. A Tabela 6 mostra a proporção de variância em cada componente principal. As Figuras 25 e 26 trazem os resultados de PCA e HCA, respectivamente. Para dar fluidez ao texto e facilitar a consulta às figuras e tabelas, as mesmas encontram-se no final desta sessão.

Os valores de clorofilas *a* e *b*, assim como sua soma foram significativamente distintos ($p \leq 0,05$) entre a maioria dos grupos de tratamentos (Apêndice C). O teste de correlação de Pearson indicou que os valores de clorofila *a* e *b* são fortemente correlacionados ($r=0,99$, $p \leq 0,05$). Por esta razão, as análises subsequentes foram realizadas apenas com os conteúdos de clorofilas totais. Detectou-se aumento nos conteúdos de clorofilas totais nos grupos expostos ao óleo diesel durante 30 min e 1 h, em relação ao observado no grupo controle (Figura 20). Os grupos expostos ao óleo diesel durante 12 h e 24 h apresentaram uma tendência de redução no conteúdo de clorofilas totais, ainda que tal comportamento não tenha sido homogêneo. Apesar disso, não foi observada correlação significativa ($p \leq 0,05$) entre os conteúdos de clorofilas totais e o tempo de exposição ou a concentração de gasolina (Tabela 4). O tempo de exposição explicou 30% da variância observada, a concentração do xenobiótico explicou 18% e a combinação destas variáveis contribuiu com aproximadamente 51% dos valores de variância de clorofilas totais (Tabela 5).

No perfil carotenóidico (Apêndice D), foram identificados luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, α -caroteno, *trans*- β -caroteno e *cis*- β -caroteno em todas as amostras. O composto não identificado descrito no perfil carotenóidico de talos expostos à gasolina (sessão 4.1.2), foi encontrado em todos os grupos expostos ao diesel, exceto nos talos expostos a 0,001% durante 12 h. Uma tendência de incremento no conteúdo deste carotenoide em vários grupos foi observada após a exposição ao xenobiótico, em relação ao grupo controle. Nos talos expostos a 0,1% de diesel durante 30 min, a zeaxantina foi detectada em apenas uma das réplicas analisadas, por esta razão não foi possível

calcular o desvio padrão da amostra. Os carotenoides zeaxantina e β -criptoxantina parecem ser os carotenoides mais sensíveis ao óleo diesel, com tendência de redução dos seus conteúdos na maioria dos grupos tratados em relação ao controle. Os conteúdos de carotenos oscilaram bastante entre os grupos, porém uma tendência de redução foi observada nos grupos expostos ao óleo diesel após 12 h e 24 h. Todavia, não foi detectada correlação significativa ($p \leq 0,05$) entre o conteúdo de carotenoides totais (Figura 21) e os fatores tempo de exposição e concentração (Tabela 4). A análise de variância multifatorial mostrou que 30% da variância observada nos conteúdos destes pigmentos foi explicada pelo tempo de exposição ao xenobiótico, 26% pela concentração deste e a combinação dos fatores permitiu explicar 35% da variância total dos dados (Tabela 5).

A exposição de *U. lactuca* ao óleo diesel reduziu drasticamente seu conteúdo de polifenóis (Figura 22, Apêndice C), embora nenhuma correlação significativa ($p \leq 0,05$) com os fatores tempo de exposição e concentração tenha sido detectada (Tabela 4). No entanto, o tempo de exposição explicou 71% da variância observada (Tabela 5).

A quantidade de açúcares solúveis (Figura 23) mostrou-se significativamente ($p \leq 0,05$) aumentada ao longo do tempo de exposição até 12 h, seguido de uma redução após 24 h (Apêndice C). Um valor de correlação positiva de 0,43 (Tabela 4) entre o conteúdo de açúcares solúveis e o tempo de exposição foi encontrado, embora não significativo ($p \leq 0,05$). Este fator foi responsável por 88% da variância dos dados (Tabela 5).

O conteúdo de amido (Figura 24) apresentou comportamento similar ao de açúcares solúveis, aumentando ao longo do tempo até 12 h de exposição, e reduzindo posteriormente (Apêndice C). Detectou-se uma correlação positiva não significativa ($p \leq 0,05$) de 0,33 entre o tempo de exposição e o conteúdo de amido (Tabela 4). A combinação dos dois fatores conseguiu explicar 80% da variância dos resultados para este metabólito (Tabela 5).

A análise de componentes principais (PCA) retornou cinco componentes, número igual ao de variáveis originais (Tabela 6). PC1 acumulou 45% da variância dos dados e, com PC2, 70% da variância. A decomposição das variáveis originais em componentes destacou a similaridade entre os grupos, uma vez que apenas os grupos expostos ao diesel durante 12 h (T3) ficaram separados dos demais grupos, em PC1 negativo (Figura 25), provavelmente influenciados pelas variáveis açúcares solúveis e amido, cujos vetores referentes aos *loadings* também ficaram posicionados em PC1 negativo. Os vetores das demais variáveis

originais ficaram em PC1 positivo, sendo que polifenóis e carotenoides ficaram em PC2 positivo e clorofilas totais ficou em PC2 negativo.

A análise de *clusters* hierárquicos (Figura 26) confirmou os resultados observados no PCA, separando em um *cluster* os grupos expostos ao diesel por 12 h (T3), e formando outros *clusters* sem separação dos grupos associada ao tempo de exposição ou à concentração de diesel.

Tabela 4 - Coeficientes de correlação de Pearson entre os fatores tempo de concentração e concentração e os dados de conteúdos de clorofilas totais, carotenoides totais, polifenóis, açúcares solúveis e amido de *U. lactuca* não exposta (controle) e exposta ao óleo diesel (0.001-1%, v/v) por 30 min, 1 h, 12 h, e 24 h. o. (*) indica $p \leq 0.05$; (***) indica $p \leq 0.01$.

	Tempo de exposição	Concentração
Clorofilas totais	-0,27	-0,12
Carotenoides	-0,15	-0,05
Polifenóis	-0,06	-0,09
Açúcares solúveis	0,43	0,06
Amido	0,33	0,15

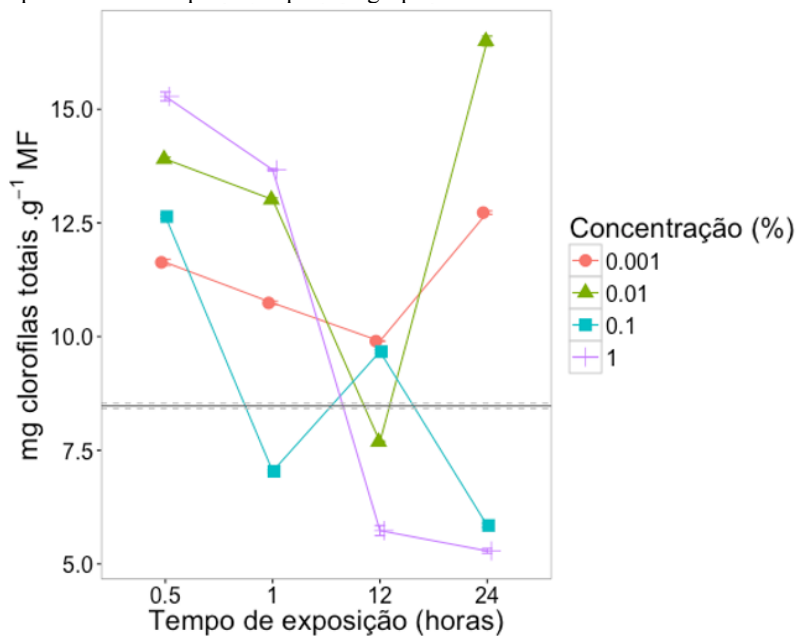
Fonte: autoria própria.

Tabela 5 - Análise de variância multifatorial (MANOVA) dos dados de conteúdos de clorofilas totais, carotenoides totais, polifenóis, açúcares solúveis e amido de *U. lactuca*, considerando o efeito do tempo de exposição e da concentração de óleo diesel, separados e combinados. Intervalo de confiança de 95% foi considerado ($p \leq 0.05$).

	Tempo de exposição	Concentração	Tempo de exposição: concentração	Resíduos
<i>Variância explicada</i>				
Clorofilas totais	0,305	0,180	0,515	0,000
Carotenoides	0,360	0,265	0,355	0,020
Polifenóis	0,712	0,043	0,155	0,090
Açúcares solúveis	0,888	0,037	0,062	0,013
Amido	0,047	0,069	0,801	0,083
<i>valores de p</i>				
Clorofilas totais	6,06E-54	1,30E-50	1,27E-55	
Carotenoides	2,19E-19	5,16E-18	2,87E-17	
Polifenóis	6,72E-13	1,07E-02	2,73E-04	
Açúcares solúveis	7,71E-29	2,50E-09	1,01E-09	
Amido	3,31E-03	1,08E-04	6,04E-15	

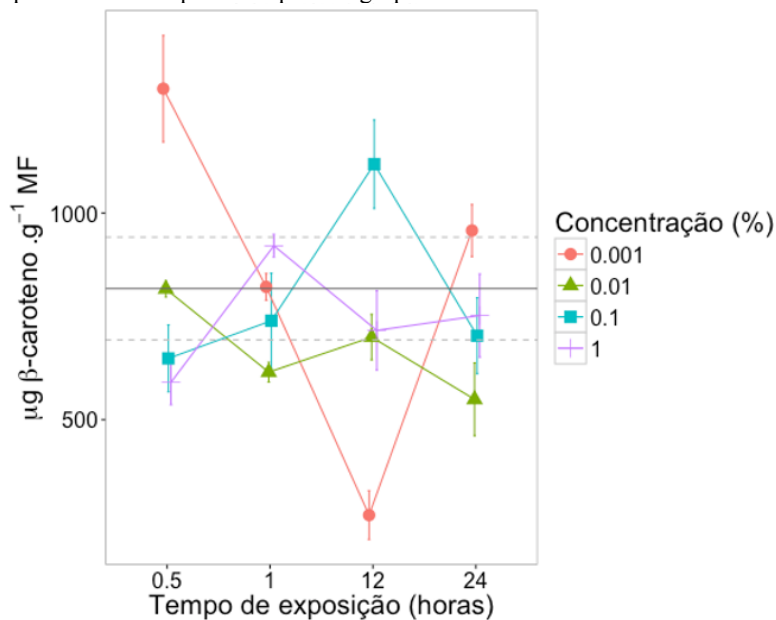
Fonte: autoria própria.

Figura 20 - Conteúdos de clorofilas totais de talos de *U. lactuca*. O grupo controle está representado pela linha escura horizontal contínua, enquanto os desvios padrão (DP) superior e inferior estão representados pelas linhas horizontais pontilhadas. Os grupos expostos ao óleo diesel estão representados pelos pontos, de acordo com o tempo de exposição (eixo X) e concentração (formato do ponto). As linhas verticais em cada ponto representam os DP superior e inferior para o respectivo grupo.



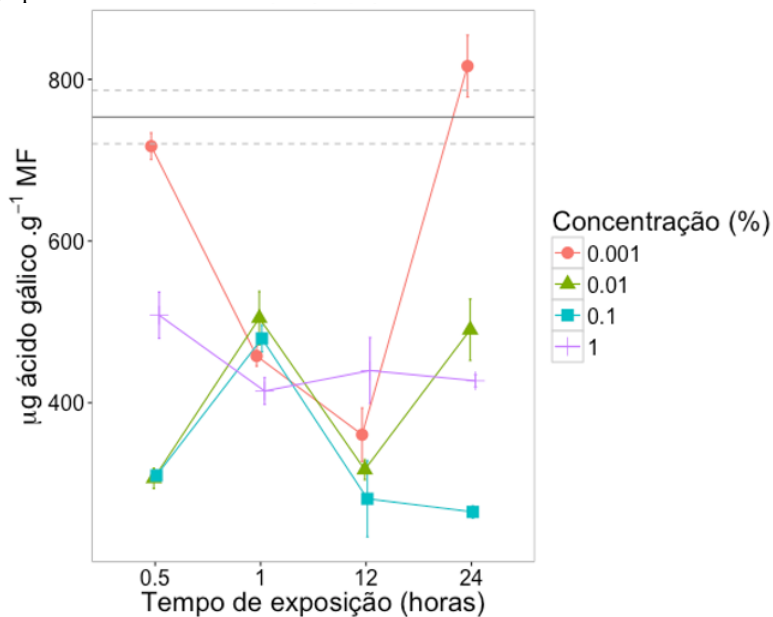
Fonte: autoria própria.

Figura 21 - Conteúdos de carotenoides totais de talos de *U. lactuca*. O grupo controle está representado pela linha escura horizontal contínua, enquanto os desvios padrão (DP) superior e inferior estão representados pelas linhas horizontais pontilhadas. Os grupos expostos ao óleo diesel estão representados pelos pontos, de acordo com o tempo de exposição (eixo X) e concentração (formato do ponto). As linhas verticais em cada ponto representam os DP superior e inferior para o respectivo grupo.



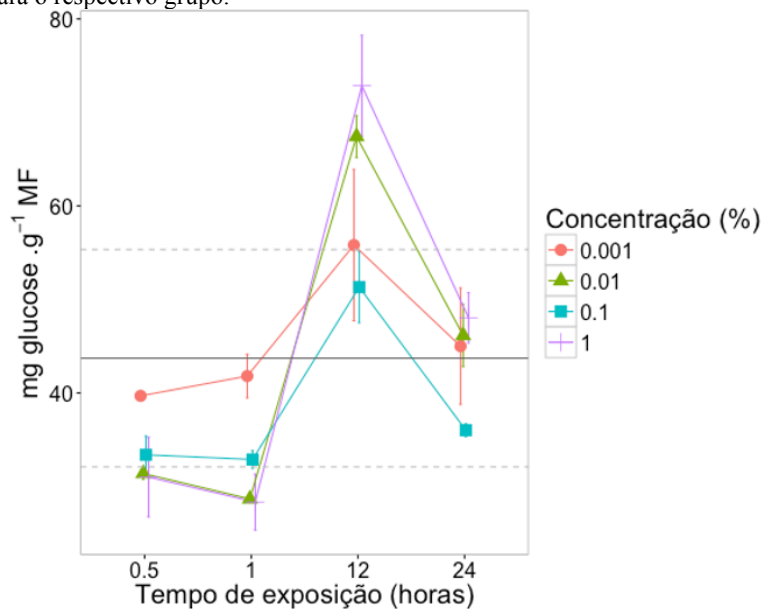
Fonte: autoria própria.

Figura 22 - Conteúdos de polifenóis de talos de *U. lactuca*. O grupo controle está representado pela linha escura horizontal contínua e os desvios padrão (DP) superior e inferior estão representados pelas linhas horizontais pontilhadas. Os grupos expostos ao óleo diesel estão representados pelos pontos de acordo com o tempo de exposição (eixo X) e concentração (formato do ponto). As linhas verticais em cada ponto representam os DP superior e inferior para o respectivo grupo.



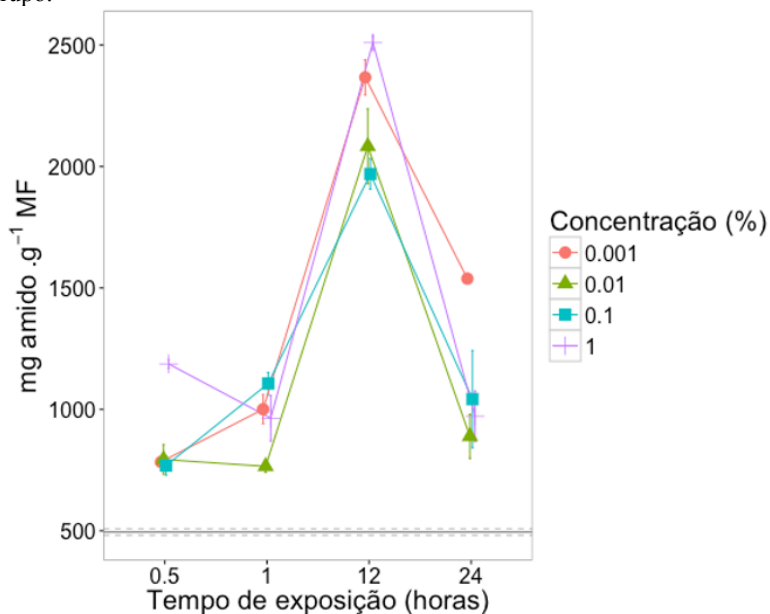
Fonte: autoria própria.

Figura 23 - Conteúdos de açúcares solúveis de talos de *U. lactuca*. O grupo controle está representado pela linha escura horizontal contínua e os desvios padrão (DP) superior e inferior estão representados pelas linhas horizontais pontilhadas. Os grupos expostos ao óleo diesel estão representados pelos pontos de acordo com o tempo de exposição (eixo X) e concentração (formato do ponto). As linhas verticais em cada ponto representam os DP superior e inferior para o respectivo grupo.



Fonte: autoria própria.

Figura 24 - Conteúdos de amido de talos de *U. lactuca*. O grupo controle está representado pela linha escura horizontal contínua e os desvios padrão (DP) superior e inferior estão representados pelas linhas horizontais pontilhadas. Os grupos expostos ao óleo diesel estão representados pelos pontos de acordo com o tempo de exposição (eixo X) e concentração (formato do ponto). As linhas verticais em cada ponto representam os DP superior e inferior para o respectivo grupo.



Fonte: autoria própria.

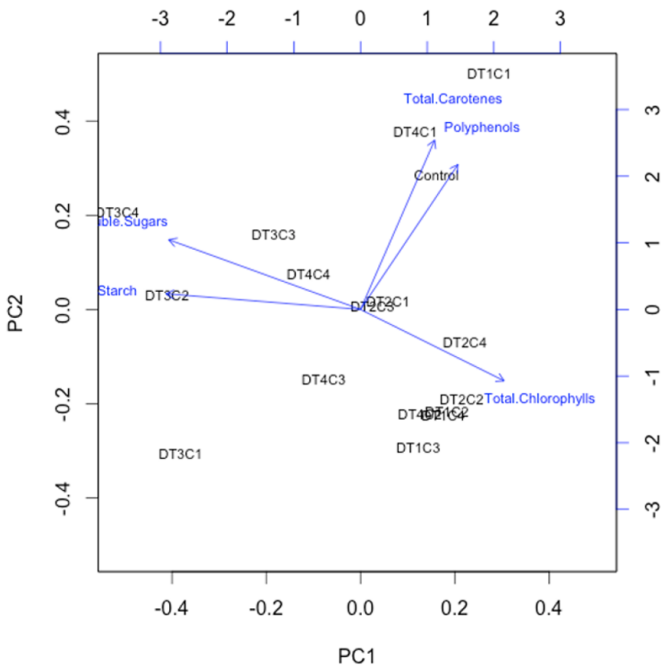
Tabela 6 - Análise de componentes principais (PCA) realizada com os conteúdos de clorofilas totais, carotenoides totais, polifenóis, açúcares solúveis e amido de *U. lactuca* não exposta (controle) e exposta ao diesel (0.001-1%, v/v) por 30 min, 1 h, 12 h, e 24 h.

Contribuição de componentes principais:

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
Desvio padrão	1,5097	1,1131	0,8797	0,7452	0,3907
Proporção da variância	0,4558	0,2478	0,1548	0,1111	0,03053
Proporção acumulada	0,4558	0,7036	0,8584	0,9695	1

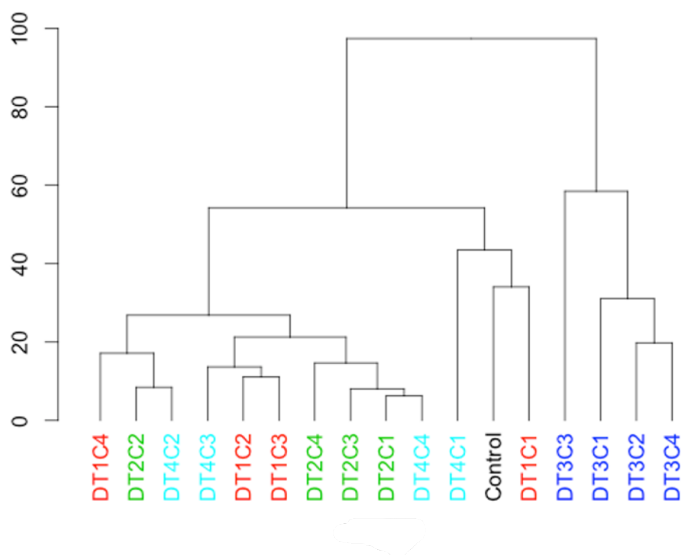
Fonte: autoria própria.

Figura 25 - PCA das variáveis bioquímicas dos talos de *U. lactuca* do grupo controle e dos grupos expostos ao diesel. Legenda dos grupos: D=diesel; Tempo de exposição: T1 = 30min, T2 = 1h, T3 = 12h, T4 = 24h; Concentração de diesel: C1 = 0.001%; C2 = 0.01%; C3 = 0.1%; C4 = 1.0%.



Fonte: autoria própria.

Figura 26 - Dendrograma de HCA das variáveis bioquímicas dos talos de *U. lactuca* do grupo controle e dos grupos expostos ao diesel. Legenda dos grupos: D=diesel; Tempo de exposição: T1 = 30min, T2 = 1h, T3 = 12h, T4 = 24h; Concentração de diesel: C1 = 0.001%; C2 = 0.01%; C3 = 0.1%; C4 = 1.0%. Cores das folhas indicadas na legenda da figura, de acordo com o tempo de exposição ao diesel.



Fonte: autoria própria.

4.3 METABOLÔMICA

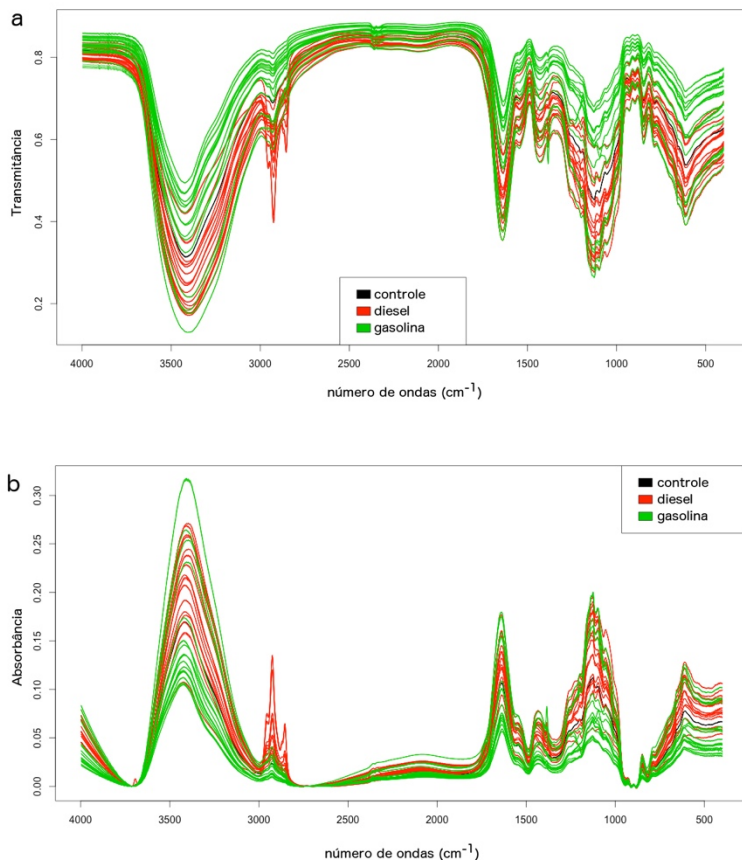
Os resultados referentes à metabolômica de *U. lactuca* exposta à gasolina e ao óleo diesel foram submetidos à publicação no dia 26 de julho de 2016, no periódico *Marine Pollution Bulletin* (Elsevier), classificado como B1 na área Ciências Biológicas I do Qualis CAPES 2014, sob o título "Metabolomics of *Ulva lactuca* Linnaeus (Chlorophyta) exposed to oil fuels: Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis as tools for metabolic fingerprint", com co-autoria de Dr.^a Fernanda Ramlov, Dr. Eder Carlos Schmidt, Christopher Costa, Eva Regina de Oliveira, Cláudia M. Bauer, Prof. Dr. Miguel Rocha, Prof.^a Dr.^a Zenilda Laurita Bouzon, Prof. Dr. Marcelo Maraschin.

4.3.1 Análise multivariada do perfil metabólico de talos de *U. lactuca* expostos à gasolina e ao óleo diesel baseado em espectroscopia vibracional de infravermelho médio (FTIR)

A análise multivariada realizada sobre o *dataset* completo, contendo os espectros da amostra controle, das amostras expostas ao óleo diesel e das amostras expostas à gasolina, procurou detectar diferenças nos perfis metabólicos dos talos expostos aos xenobióticos por métodos de análise multivariada.

Os dados foram inicialmente transformados de transmitância para absorbância. Em seguida, foram submetidos ao pré-processamento, no qual métodos de normalização, correção de linha de base, *smoothing* e derivada foram utilizados separadamente ou combinados. Análises de componentes principais (PCA) e de *clusters* hierárquicos (HCA) foram realizadas nos dados após cada opção de métodos, a fim de identificar o método/combinção que proporciona a melhor classificação amostral. Os resultados mais satisfatórios foram obtidos com a sequência seguinte: normalização dos dados pela mediana, seguido da correção de linha de base pelo método *Modified Polynomial Fitting* (MPF). Nas figuras 27a e b, os espectros antes e após o pré-processamento são mostrados.

Figura 27 - Espectros de FTIR dos talos de *U. lactuca* do grupo controle e dos grupos expostos ao óleo diesel e à gasolina: a) sem pré-processamento; b) após transformação de transmitância para absorbância + normalização (mediana) + correção de linha de base (MPF).



Fonte: autoria própria.

Os dados pré-processados foram submetidos à PCA, *k-means* e HCA, considerando a janela espectral de (4000 a 400 cm^{-1}), ou intervalos de interesse que serão especificados a seguir.

Na PCA realizada sobre a janela espectral total do *dataset*, PC1 explicou 80% da variância dos dados e PC2 respondeu por 11% da variância (Tabela 7). Onze dos 16 grupos expostos ao óleo diesel

ocorreram em PC1 positivo e 3 situaram-se muito próximas no eixo de PC1 (Figura 28), enquanto que o grupo controle e doze grupos expostos à gasolina ficaram em PC1 negativo. Para a análise de *k-means*, inicialmente utilizou-se $n = 2$ grupos, para verificar se esta análise conseguiria agrupar amostras expostas ao óleo diesel e à gasolina corretamente. O grupo 1 (Figura 29) contém 11 grupos expostos ao diesel e 4 expostos à gasolina. O controle foi agrupado juntamente com 12 grupos expostos à gasolina e 5 grupos expostos ao diesel no grupo 2. Na análise de HCA, quatro grandes *clusters* ficaram destacados no dendrograma (Figura 30). O primeiro, à esquerda, é constituído por 11 amostras expostas à gasolina e 1 exposta ao diesel. Os outros três *clusters* são compostos majoritariamente por amostras expostas ao diesel, porém 5 amostras expostas à gasolina foram agrupadas nestes ramos, além do grupo controle, que se encontra na extremidade direita do dendrograma, sugerindo alguma diferença metabólica relevante em relação aos grupos tratados. Embora o perfil metabólico de alguns grupos expostos à gasolina e ao óleo diesel tenha levado à alocação incorreta destes nos *clusters*, os resultados obtidos tanto pela análise de *k-means* quanto por HCA demonstraram a eficiência desta abordagem analítica à discriminação das amostras expostas aos xenobióticos.

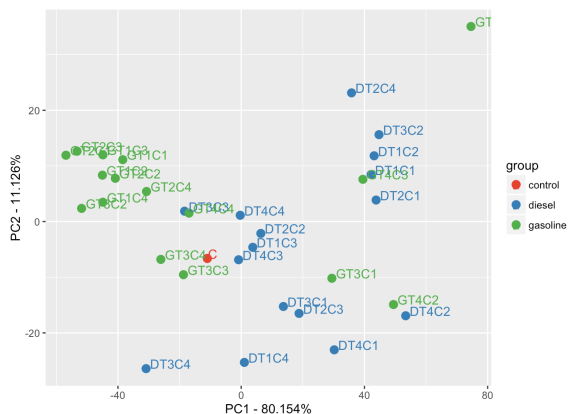
Tabela 7: Resumo da análise de componentes principais (PCA) dos espectros de FTIR dos talos de *U. lactuca* do grupo controle e dos grupos expostos ao diesel e à gasolina, após normalização (mediana) e correção da linha de base (MPF) dos dados. Os dados relacionados na tabela referem-se ao *dataset* utilizado na análise, a proporção de variância individual e acumulada em PC1 e PC2.

D + G refere-se ao *dataset* sem os dados do grupo controle.

Conjunto analisado	Contribuição de PC1	Contribuição de PC2	Contribuição acumulada (PC1 + PC2)
Espectro total	0,8015	0,1113	0,9128
D + G	0,8019	0,1114	0,9133
Carboidratos	0,8251	0,1523	0,9774
Proteínas	0,9842	0,0127	0,9969
Lipídios	0,8839	0,0875	0,9714
<i>Fingerprint</i>	0,9828	0,0150	0,9978

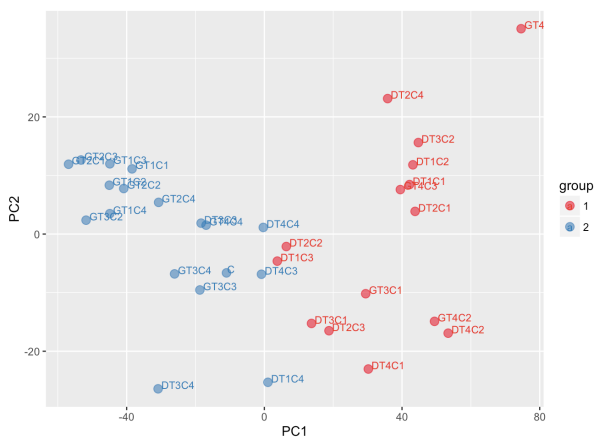
Fonte: autoria própria.

Figura 28 – Gráfico de *scores* da PCA dos espectros de FTIR dos talos de *U. lactuca* dos grupos controle e dos expostos ao óleo diesel e à gasolina, após normalização (mediana) e correção da linha de base (MPF). Janela de absorvância: 4000-400 cm^{-1} . Legenda dos grupos: D = Diesel, G = Gasolina, C = Controle; Tempo de exposição: T1 = 30min, T2 = 1h, T3 = 12h, T4 = 24h; Concentração de óleo diesel/gasolina: C1 = 0.001%; C2 = 0.01%; C3 = 0.1%; C4 = 1.0%.



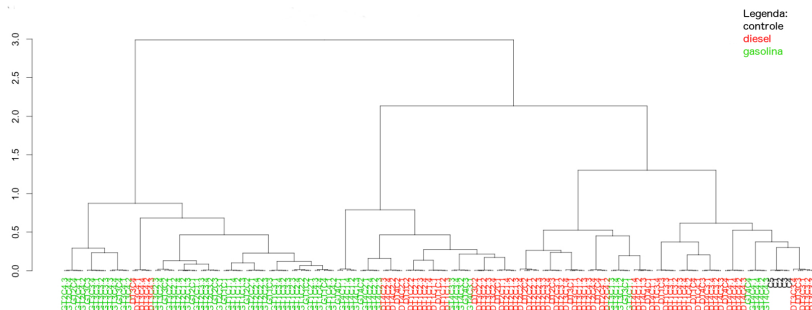
Fonte: autoria própria.

Figura 29 – Gráfico de agrupamentos da análise de *k-means* dos espectros de FTIR dos talos de *U. lactuca* dos grupos controle e dos expostos ao óleo diesel e à gasolina, após normalização (mediana) e correção da linha de base (MPF). Janela de absorvância: 4000-400 cm^{-1} . Legenda dos grupos: D = Diesel, G = Gasolina, C = Controle; Tempo de exposição: T1 = 30min, T2 = 1h, T3 = 12h, T4 = 24h; Concentração de óleo diesel/gasolina: C1 = 0.001%; C2 = 0.01%; C3 = 0.1%; C4 = 1.0%.



Fonte: autoria própria.

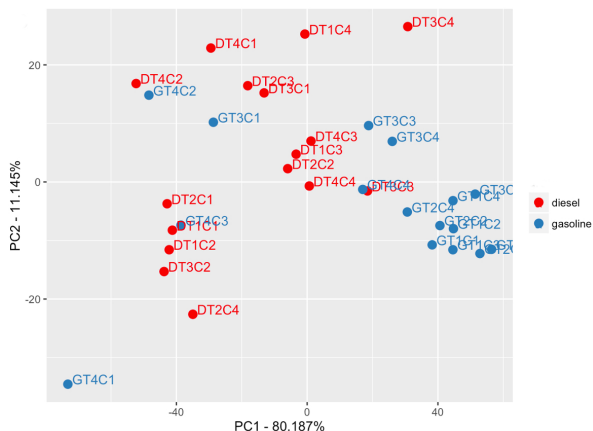
Figura 30 - Dendrograma de HCA dos espectros de FTIR dos talos de *U. lactuca* do grupo controle e dos grupos expostos ao óleo diesel e à gasolina, após normalização (mediana) e correção da linha de base (MPF). Janela de absorvância: 4000-400 cm^{-1} . Legenda dos grupos: D = Diesel, G = Gasolina, C = Controle; Tempo de exposição: T1 = 30min, T2 = 1h, T3 = 12h, T4 = 24h; Concentração de óleo diesel/gasolina: C1 = 0.001%; C2 = 0.01%; C3 = 0.1%; C4 = 1.0%; Cores das folhas indicadas na legenda da figura de acordo com o tratamento.



Fonte: autoria própria.

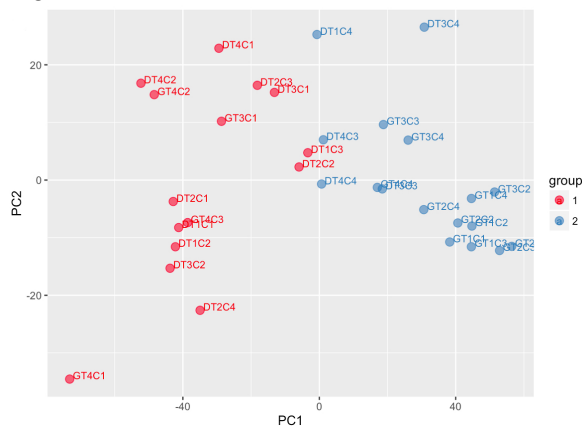
A seguir, os dados de FTIR referentes ao grupo controle foram removidos do *dataset*, a fim de se verificar como as amostras tratadas seriam classificadas. A variância acumulada em PC2 foi de 91% (Tabela 11), semelhante ao resultado da PCA feita com grupos tratados e grupo controle. De maneira interessante, a remoção do grupo controle promoveu a realocação dos grupos em PC1 e PC2 de forma inversa e espelhada (Figura 31). Neste gráfico, os grupos expostos à gasolina concentram-se majoritariamente em PC1 positivo e PC2 negativo. Já a maioria dos grupos expostos ao óleo diesel dispersaram-se em PC1 negativo. O grupo 1 da análise de *k-means* contém 11 grupos expostos ao diesel e 4 expostos à gasolina; o grupo 2 é formado por 12 grupos expostos à gasolina e 5 expostos ao diesel (Figura 32). Na análise de *clusters* hierárquicos (Figura 33), a remoção do grupo controle modificou bastante a classificação das amostras, diminuindo a separação relacionada ao combustível a que foram expostos os talos.

Figura 31 – Gráfico de *scores* da PCA dos espectros de FTIR dos talos de *U. lactuca* dos grupos expostos ao óleo diesel e à gasolina, após normalização (mediana) e correção da linha de base (MPF). Janela de absorvância: 4000-400 cm^{-1} . Legenda dos grupos: D = Diesel, G = Gasolina; Tempo de exposição: T1 = 30min, T2 = 1h, T3 = 12h, T4 = 24h; Concentração de óleo diesel/gasolina: C1 = 0.001%; C2 = 0.01%; C3 = 0.1%; C4 = 1.0%.



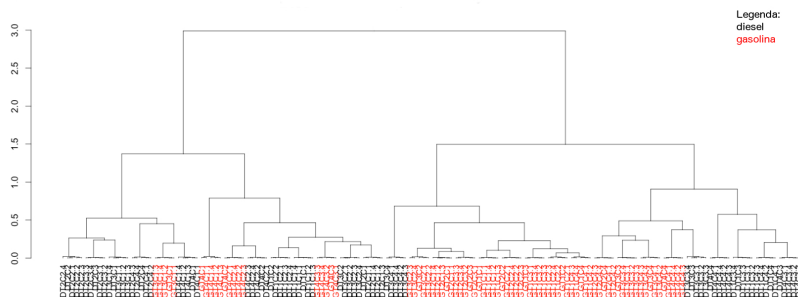
Fonte: autoria própria.

Figura 32 – Gráfico de agrupamentos da análise de *k-means* dos espectros de FTIR dos talos de *U. lactuca* dos grupos expostos ao óleo diesel e à gasolina, após normalização (mediana) e correção da linha de base (MPF). Janela de absorvância: 4000-400 cm^{-1} . Legenda dos grupos: D = Diesel, G = Gasolina; Tempo de exposição: T1 = 30min, T2 = 1h, T3 = 12h, T4 = 24h; Concentração de óleo diesel/gasolina: C1 = 0.001%; C2 = 0.01%; C3 = 0.1%; C4 = 1.0%.



Fonte: autoria própria.

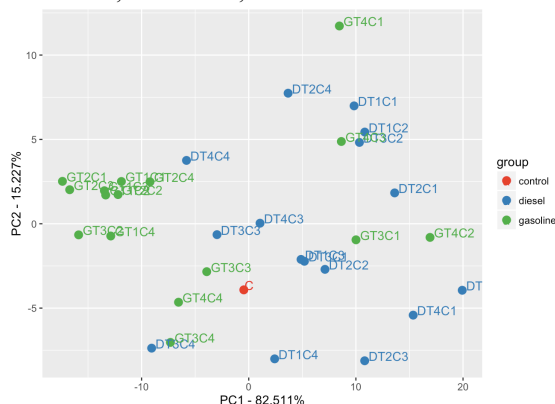
Figura 33 - Dendrograma de HCA dos espectros de FTIR dos talos de *U. lactuca* dos grupos expostos ao óleo diesel e à gasolina, após normalização (mediana) e correção da linha de base (MPF). Janela de absorvância: 4000-400 cm^{-1} . Legenda dos grupos: D = Diesel, G = Gasolina; Tempo de exposição: T1 = 30min, T2 = 1h, T3 = 12h, T4 = 24h; Concentração de óleo diesel/gasolina: C1 = 0.001%; C2 = 0.01%; C3 = 0.1%; C4 = 1.0%; Cores das folhas indicadas na legenda da figura de acordo com o tratamento.



Fonte: autoria própria.

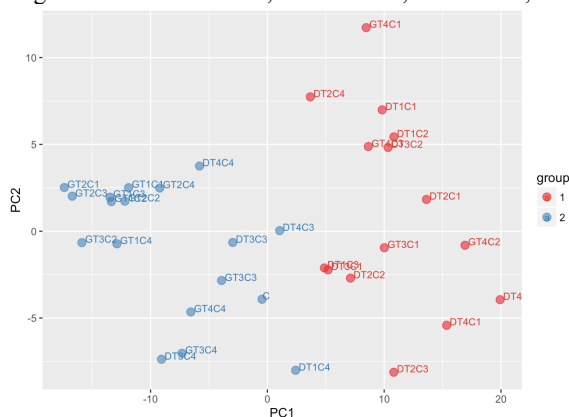
Ao realizar a PCA na janela espectral referente à absorvância dos carboidratos (1200-900 cm^{-1}), PC1 foi responsável por 82% da variância amostral, alcançando 97% com a contribuição de PC2 (Tabela 11). Em PC1 positivo, estão 13 grupos expostos ao óleo diesel e 4 expostos à gasolina (Figura 34). O grupo controle ficou próximo ao eixo de PC1, 12 grupos expostos à gasolina e 3 expostos ao diesel ficaram em PC1 negativo. A classificação amostral resultante das análises de *k-means* e HCA foi semelhante ao obtido quando do uso do conjunto total de dados espectrais, i.e., 4000 a 400 cm^{-1} (Figura 35 e 36).

Figura 34 – Gráfico de *scores* da PCA dos espectros de FTIR dos talos de *U. lactuca* dos grupos controle e dos expostos ao óleo diesel e à gasolina, após normalização (mediana) e correção da linha de base (MPF). Janela de absorvância: 1200-900 cm^{-1} , atribuída às absorvâncias de carboidratos. Legenda dos grupos: D = Diesel, G = Gasolina, C = Controle; Tempo de exposição: T1 = 30min, T2 = 1h, T3 = 12h, T4 = 24h; Concentração de óleo diesel/gasolina: C1 = 0.001%; C2 = 0.01%; C3 = 0.1%; C4 = 1.0%.



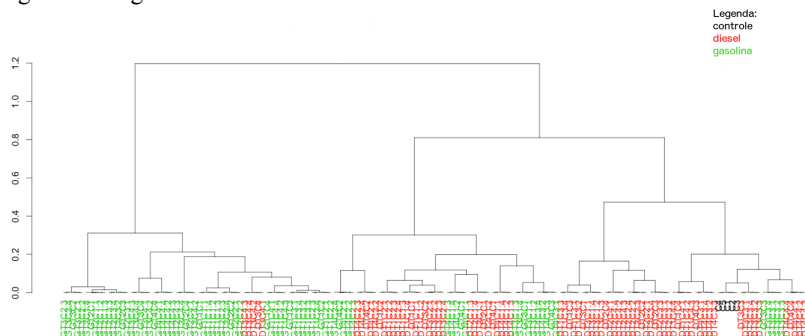
Fonte: autoria própria.

Figura 35 – Gráfico de agrupamentos da análise de *k-means* dos espectros de FTIR dos talos de *U. lactuca* dos grupos controle e dos expostos ao óleo diesel e à gasolina, após normalização (mediana) e correção da linha de base (MPF). Janela de absorvância: 1200-900 cm^{-1} , atribuída às absorvâncias de carboidratos. Legenda dos grupos: D = Diesel, G = Gasolina, C = Controle; Tempo de exposição: T1 = 30min, T2 = 1h, T3 = 12h, T4 = 24h; Concentração de óleo diesel/gasolina: C1 = 0.001%; C2 = 0.01%; C3 = 0.1%; C4 = 1.0%.



Fonte: autoria própria.

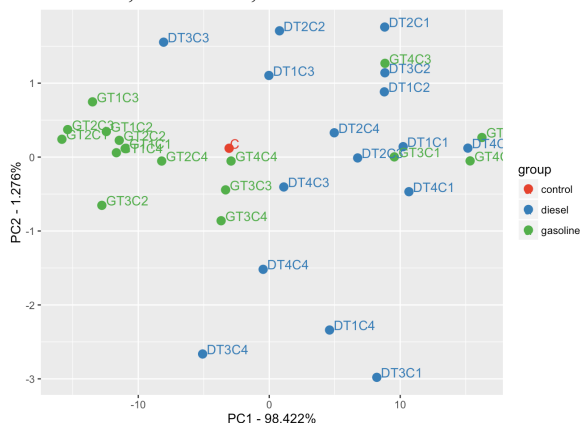
Figura 36 - Dendrograma de HCA dos espectros de FTIR dos talos de *U. lactuca* dos grupos controle e dos expostos ao óleo diesel e à gasolina, após normalização (mediana) e correção da linha de base (MPF). Janela de absorvância: 1200-900 cm^{-1} , atribuída às absorvâncias de carboidratos. Legenda dos grupos: D = Diesel, G = Gasolina, C = Controle; Tempo de exposição: T1 = 30min, T2 = 1h, T3 = 12h, T4 = 24h; Concentração de óleo diesel/gasolina: C1 = 0.001%; C2 = 0.01%; C3 = 0.1%; C4 = 1.0%; Cores das folhas indicadas na legenda da figura de acordo com o tratamento.



Fonte: autoria própria.

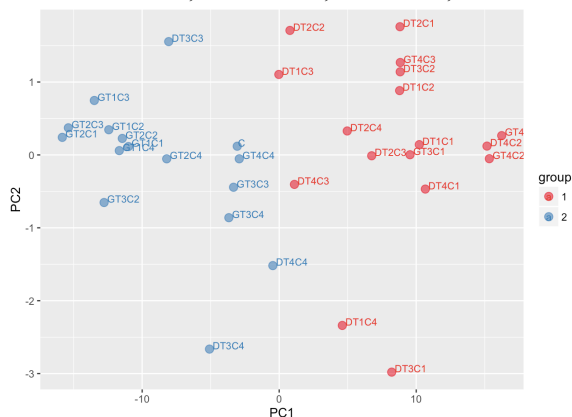
Na janela espectral referente à absorvância de proteínas (1700-1500 cm^{-1}), 98% da variância observada foi explicada por PC1 (Tabela 11). Como observado anteriormente, PC1 positivo concentrou a maior parte dos grupos expostos ao óleo diesel, e a maior parte dos grupos expostos à gasolina ficaram localizados em PC1 negativo (Figura 37). A análise de *k-means* agrupou 13 amostras expostas ao óleo diesel e 4 expostas à gasolina no grupo 1, enquanto no grupo 2, 12 amostras expostas à gasolina, 3 expostas ao diesel e o controle (Figura 38). Na HCA (Figura 39), o agrupamento relacionado ao tipo de combustível ocorre para grande parte das amostras, como tem sido observado nos HCAs anteriores.

Figura 37 – Gráfico de *scores* da PCA dos espectros de FTIR dos talos de *U. lactuca* dos grupos controle e dos expostos ao óleo diesel e à gasolina, após normalização (mediana) e correção da linha de base (MPF). Janela de absorvância: 1700-1500 cm^{-1} , atribuída às absorvâncias de proteínas. Legenda dos grupos: D = Diesel, G = Gasolina, C = Controle; Tempo de exposição: T1 = 30min, T2 = 1h, T3 = 12h, T4 = 24h; Concentração de óleo diesel/gasolina: C1 = 0.001%; C2 = 0.01%; C3 = 0.1%; C4 = 1.0%.



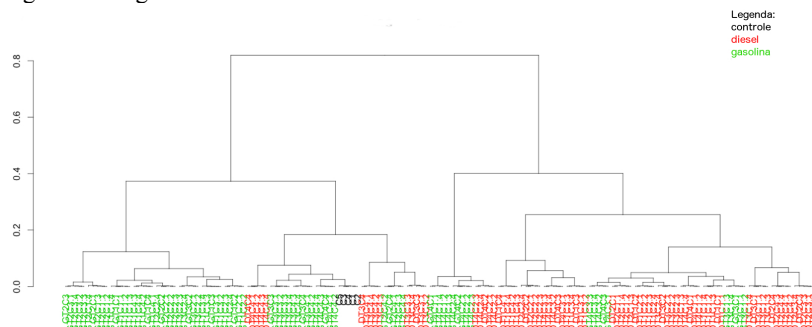
Fonte: autoria própria.

Figura 38 – Gráfico de agrupamentos da análise de *k-means* dos espectros de FTIR dos talos de *U. lactuca* dos grupos controle e dos expostos ao óleo diesel e à gasolina, após normalização (mediana) e correção da linha de base (MPF). Janela de absorvância: 1700-1500 cm^{-1} , atribuída às absorvâncias de proteínas. Legenda dos grupos: D = Diesel, G = Gasolina, C = Controle; Tempo de exposição: T1 = 30min, T2 = 1h, T3 = 12h, T4 = 24h; Concentração de óleo diesel/gasolina: C1 = 0.001%; C2 = 0.01%; C3 = 0.1%; C4 = 1.0%.



Fonte: autoria própria.

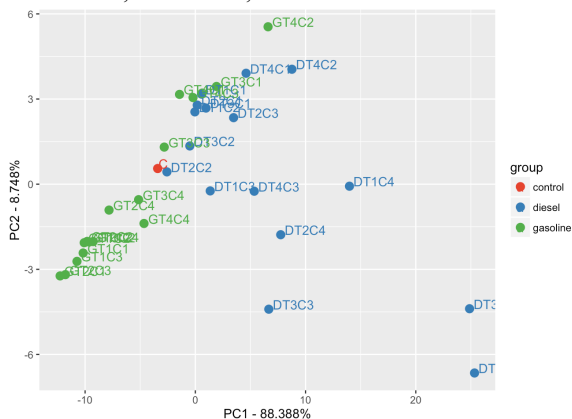
Figura 39 - Dendrograma de HCA dos espectros de FTIR dos talos de *U. lactuca* dos grupos controle e dos expostos ao óleo diesel e à gasolina, após normalização (mediana) e correção da linha de base (MPF). Janela de absorvância: $1700\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$, atribuída às absorvâncias de proteínas. Legenda dos grupos: D = Diesel, G = Gasolina, C = Controle; Tempo de exposição: T1 = 30min, T2 = 1h, T3 = 12h, T4 = 24h; Concentração de óleo diesel/gasolina: C1 = 0.001%; C2 = 0.01%; C3 = 0.1%; C4 = 1.0%; Cores das folhas indicadas na legenda da figura de acordo com o tratamento.



Fonte: autoria própria.

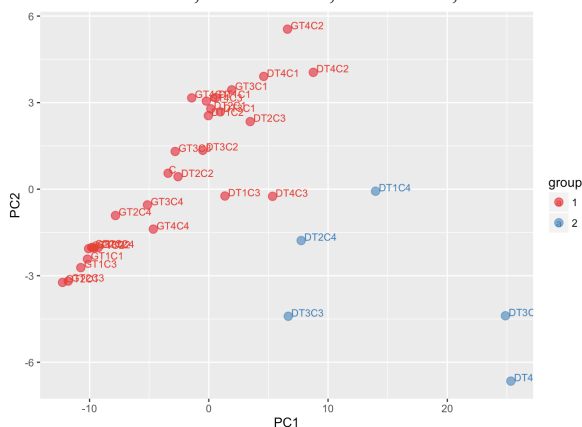
Na análise de componentes principais da região espectral de absorvância dos lipídios ($2900\text{--}2700\text{ cm}^{-1}$), PC1 permitiu explicar 88% da variância dos dados e, somado a PC2, uma substancial melhora, i.e., 97% da variância, foi observada. No entanto, isso não refletiu em melhor separação das amostras, como demonstrado no gráfico dos *scores* (Figura 40). A análise de *k-means* demonstrou a similaridade da constituição lipídica dos talos ao agrupar em um único grupo 28 amostras, colocando no segundo grupo apenas 5 amostras expostas ao óleo diesel (Figura 41). No dendrograma de resultados da HCA, as amostras são dispostas em três grandes blocos, dois compostos principalmente por amostras expostas ao óleo diesel, e um majoritariamente composto por amostras expostas à gasolina e pelo grupo controle (Figura 42).

Figura 40 – Gráfico de *scores* da PCA dos espectros de FTIR dos talos de *U. lactuca* dos grupos controle e dos expostos ao óleo diesel e à gasolina, após normalização (mediana) e correção da linha de base (MPF). Janela de absorvância: 2900-2700 cm^{-1} , atribuída às absorvâncias de lipídios. Legenda dos grupos: D = Diesel, G = Gasolina, C = Controle; Tempo de exposição: T1 = 30min, T2 = 1h, T3 = 12h, T4 = 24h; Concentração de óleo diesel/gasolina: C1 = 0.001%; C2 = 0.01%; C3 = 0.1%; C4 = 1.0%.



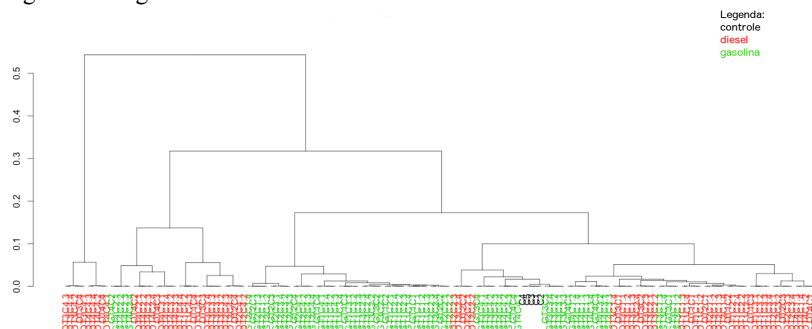
Fonte: autoria própria.

Figura 41 – Gráfico de agrupamentos da análise de *k-means* dos espectros de FTIR dos talos de *U. lactuca* dos grupos controle e dos expostos ao óleo diesel e à gasolina, após normalização (mediana) e correção da linha de base (MPF). Janela de absorvância: 2900-2700 cm^{-1} , atribuída às absorvâncias de lipídios. Legenda dos grupos: D = Diesel, G = Gasolina, C = Controle; Tempo de exposição: T1 = 30min, T2 = 1h, T3 = 12h, T4 = 24h; Concentração de óleo diesel/gasolina: C1 = 0.001%; C2 = 0.01%; C3 = 0.1%; C4 = 1.0%.



Fonte: autoria própria.

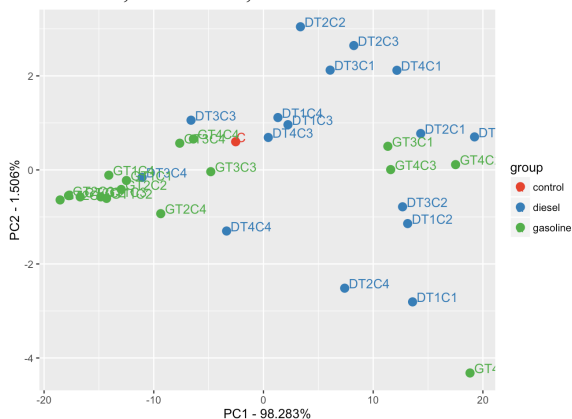
Figura 42 - Dendrograma de HCA dos espectros de FTIR dos talos de *U. lactuca* dos grupos controle e dos expostos ao óleo diesel e à gasolina, após normalização (mediana) e correção da linha de base (MPF). Janela de absorvância: 2900-2700 cm^{-1} , atribuída às absorvâncias de lipídios. Legenda dos grupos: D = Diesel, G = Gasolina, C = Controle; Tempo de exposição: T1 = 30min, T2 = 1h, T3 = 12h, T4 = 24h; Concentração de óleo diesel/gasolina: C1 = 0.001%; C2 = 0.01%; C3 = 0.1%; C4 = 1.0%; Cores das folhas indicadas na legenda da figura de acordo com o tratamento.



Fonte: autoria própria.

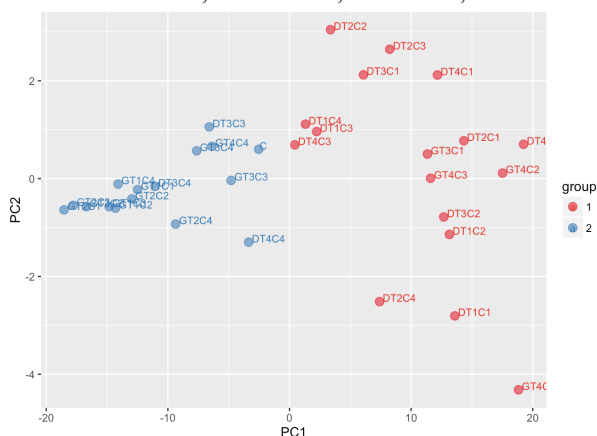
Os resultados obtidos pela PCA da região de *fingerprint* das amostras (800-500 cm^{-1}) foram similares ao observado nas demais PCAs (exceto para a região de lipídios). Os grupos tratados com óleo diesel localizam-se prevalentemente em PC1 positivo, enquanto que PC1 negativo abrigou a maior parte dos grupos expostos à gasolina e o grupo controle (Figura 43). 98% da variância dos dados foi explicada por PC1 (Tabela 11). Doze grupos expostos à gasolina, 3 expostos ao diesel e o controle foram agrupados pela análise de *k-means* (Figura 44). Em outro grupo, ficaram 13 amostras expostas ao diesel e 4 expostas à gasolina. A HCA da região de *fingerprint* apresentou menor capacidade de agrupar as amostras de acordo com o tratamento dos grupos (Figura 45), comparada às HCAs realizadas com os conjuntos testados anteriormente.

Figura 43 – Gráfico de *scores* da PCA dos espectros de FTIR dos talos de *U. lactuca* dos grupos controle e dos expostos ao óleo diesel e à gasolina, após normalização (mediana) e correção da linha de base (MPF). Janela de absorvância: 800-500 cm^{-1} , atribuída às absorvâncias de *fingerprinth*. Legenda dos grupos: D = Diesel, G = Gasolina, C = Controle; Tempo de exposição: T1 = 30min, T2 = 1h, T3 = 12h, T4 = 24h; Concentração de óleo diesel/gasolina: C1 = 0.001%; C2 = 0.01%; C3 = 0.1%; C4 = 1.0%.



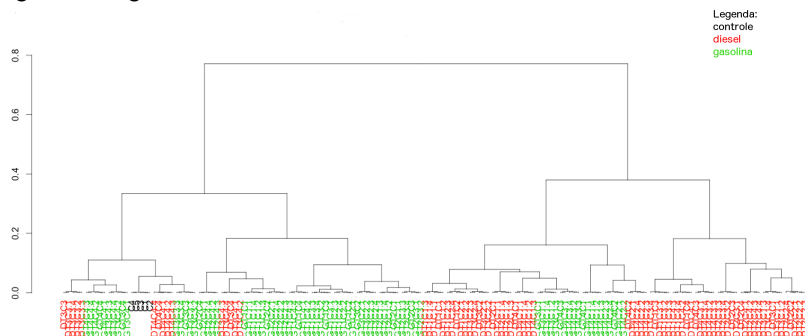
Fonte: autoria própria.

Figura 44 – Gráfico de agrupamentos da análise de *k-means* dos espectros de FTIR dos talos de *U. lactuca* dos grupos controle e dos expostos ao óleo diesel e à gasolina, após normalização (mediana) e correção da linha de base (MPF). Janela de absorvância: 800-500 cm^{-1} , atribuída às absorvâncias de *fingerprinth*. Legenda dos grupos: D = Diesel, G = Gasolina, C = Controle; Tempo de exposição: T1 = 30min, T2 = 1h, T3 = 12h, T4 = 24h; Concentração de óleo diesel/gasolina: C1 = 0.001%; C2 = 0.01%; C3 = 0.1%; C4 = 1.0%.



Fonte: autoria própria.

Figura 45 - Dendrograma de HCA dos espectros de FTIR dos talos de *U. lactuca* dos grupos controle e dos expostos ao óleo diesel e à gasolina, após normalização (mediana) e correção da linha de base (MPF). Janela de absorvância: 800-500 cm^{-1} , atribuída às absorvâncias de *fingerprint*. Legenda dos grupos: D = Diesel, G = Gasolina, C = Controle; Tempo de exposição: T1 = 30min, T2 = 1h, T3 = 12h, T4 = 24h; Concentração de óleo diesel/gasolina: C1 = 0.001%; C2 = 0.01%; C3 = 0.1%; C4 = 1.0%; Cores das folhas indicadas na legenda da figura de acordo com o tratamento.



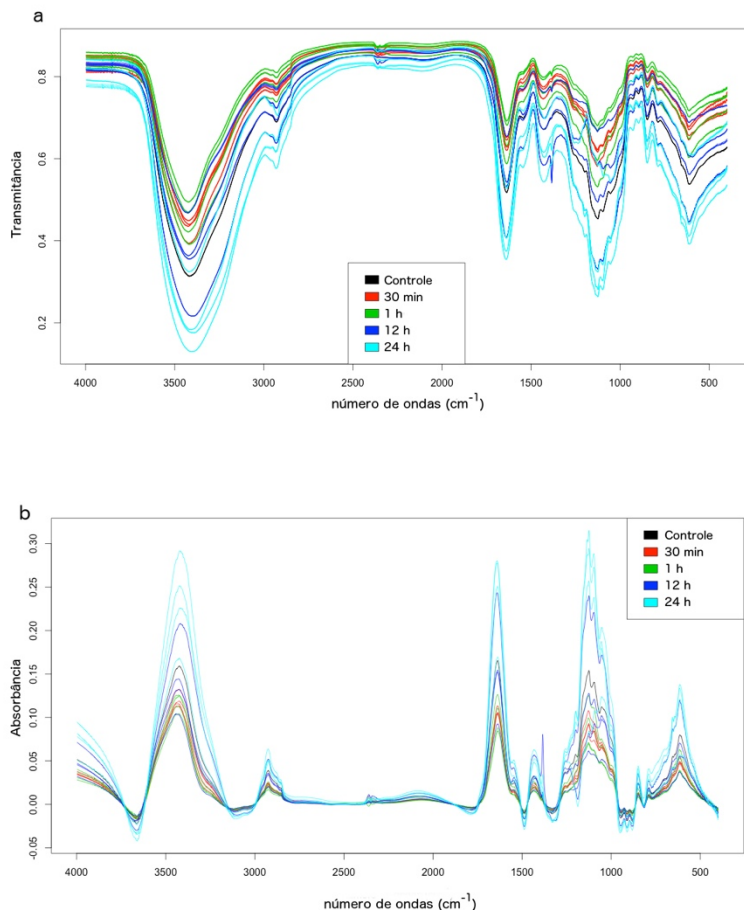
Fonte: autoria própria.

4.3.2 Análise multivariada do perfil metabólico de talos de *U. lactuca* expostos à gasolina

Num segundo momento, após a constatação da existência de diferenças de perfis metabólicos de talos expostos ao óleo diesel ou à gasolina em relação ao controle, os dados de FTIR das amostras expostas à gasolina e do grupo controle foram investigados, buscando identificar alterações metabólicas decorrentes do tempo de exposição e concentração daquele derivado de petróleo.

Da mesma maneira como foi descrito no item 4.3.1, o *dataset* foi transformado de transmitância para absorvância e submetido ao pré-processamento, testando-se o efeito dos métodos de normalização, correção de linha de base, *smoothing* e derivada separadamente ou em combinação. Posteriormente, análises de componentes principais e de *clusters* hierárquicos foram realizadas para identificar o método/combinação que proporcionou o melhor agrupamento das amostras, em função das variáveis em estudo. Os resultados mais satisfatórios foram obtidos utilizando apenas a correção de linha de base pelo método *Asymmetric Least Squares* (ALS). Nas figuras 46a e b são mostrados os espectros antes e após o pré-processamento.

Figura 46 - Espectros de FTIR dos talos de *U. lactuca* do grupo controle e dos grupos expostos à gasolina, a) sem pré-processamento; b) após transformação de transmitância para absorbância + correção da linha de base (ALS) + junção de réplicas (média). Legenda: cores dos espectros de acordo com o tempo de exposição à gasolina.



Fonte: autoria própria.

Na análise de componentes principais (PCA), PC1 conseguiu explicar de 80% (espectro total) a 96% (intervalo referente ao *fingerprint*) da variância dos dados (Tabela 8). Os *scores* dos PCAs são mostrados nas Figuras 47 - 51.

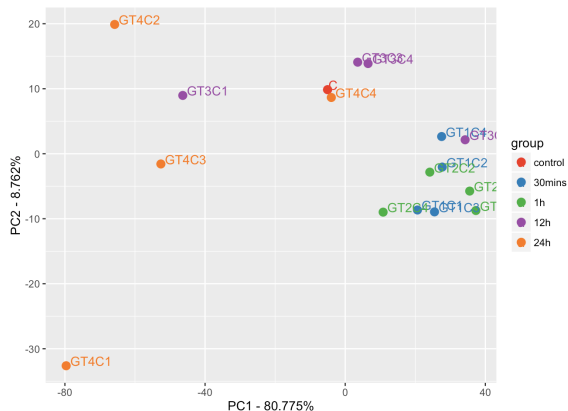
Tabela 8: Resumo da análise de componentes principais dos espectros de FTIR dos talos de *U. lactuca* dos grupos controle e expostos à gasolina, após transformação de transmitância para absorvância e correção da linha de base (ALS). Os dados relacionados na tabela referem-se ao *dataset* utilizado na análise, a proporção de variância individual e acumulada em PC1 e PC2.

<i>Dataset</i> analisado	Contribuição de PC1	Contribuição de PC2	Contribuição acumulada (PC1 + PC2)
Espectro total	0,8077	0,0876	0,8954
Carboidratos	0,9108	0,0748	0,9856
Proteínas	0,9498	0,0391	0,9889
Lipídios	0,8759	0,0822	0,9580
<i>Fingerprint</i>	0,9617	0,0308	0,9925

Fonte: autoria própria.

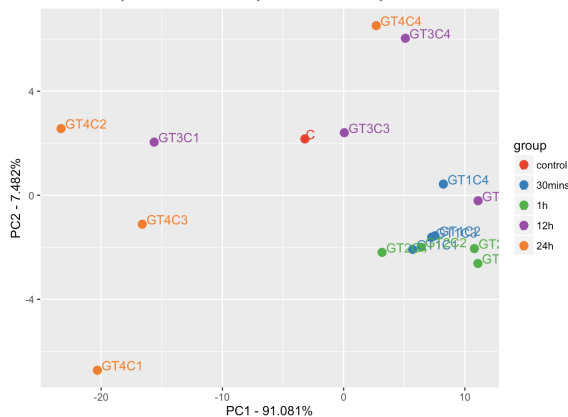
Observou-se que os perfis metabólicos dos talos expostos à gasolina durante 30 min ou 1 h foram semelhantes entre si, independente da janela espectral de interesse, e.g., $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ (Figura 47) e absorvâncias das regiões de carboidratos, proteínas e lipídios (Figuras 48, 49, 50, respectivamente). Os grupos de talos expostos à gasolina durante 12 h apresentaram os perfis metabólicos distintos. Dentre eles, o grupo exposto a 0,01% de gasolina durante 12 h (GT3C2) apresentou perfil metabólico semelhante aos talos expostos àqueles expostos à gasolina por 30 min ou 1 h, em todos os intervalos espectrais analisados; o grupo exposto a 0,001% apresentou perfil metabólico mais semelhante aos grupos expostos durante 24 h. De interesse, ressalta-se que o modelo derivado da PCA para os dados de absorvâncias de compostos lipídicos (Figura 50) gerou a melhor discriminação das amostras expostas dos talos expostos à gasolina por 24 h.

Figura 47 - Gráfico de *scores* da PCA dos espectros de FTIR dos talos de *U. lactuca* dos grupos controle e dos expostos à gasolina, após correção da linha de base (ALS). Janela de absorvância: 4000-400 cm^{-1} . Legenda dos grupos: G = Gasolina, C = Controle; Tempo de exposição: T1 = 30min, T2 = 1h, T3 = 12h, T4 = 24h; Concentração de gasolina: C1 = 0.001%; C2 = 0.01%; C3 = 0.1%; C4 = 1.0%.



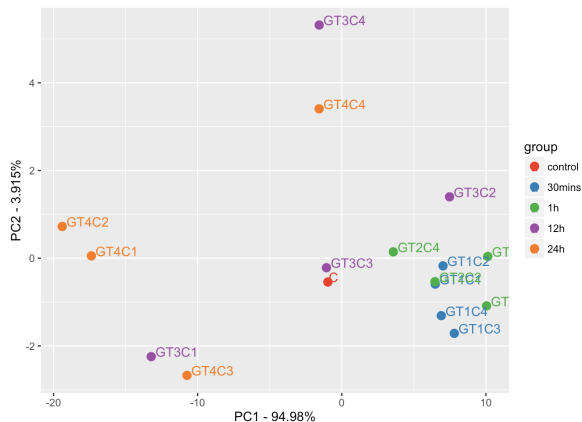
Fonte: autoria própria.

Figura 48 - Gráfico de *scores* da PCA dos espectros de FTIR dos talos de *U. lactuca* dos grupos controle e dos expostos à gasolina, após correção da linha de base (ALS). Janela de absorvância: 1200-900 cm^{-1} , atribuída às absorvâncias de carboidratos. Legenda dos grupos: G = Gasolina, C = Controle; Tempo de exposição: T1 = 30min, T2 = 1h, T3 = 12h, T4 = 24h; Concentração de gasolina: C1 = 0.001%; C2 = 0.01%; C3 = 0.1%; C4 = 1.0%.



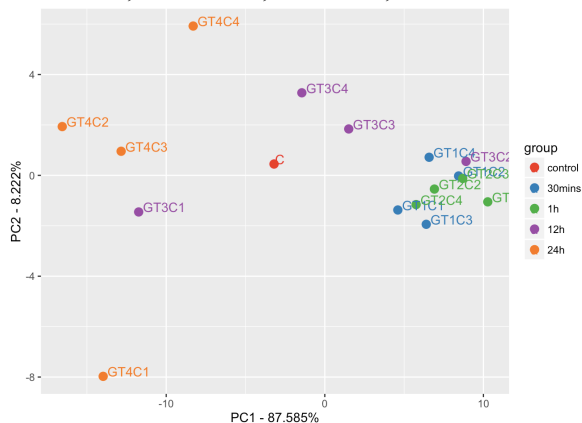
Fonte: autoria própria.

Figura 49 - Gráfico de *scores* da PCA dos espectros de FTIR dos talos de *U. lactuca* dos grupos controle e dos expostos à gasolina, após correção da linha de base (ALS). Janela de absorvância: 1700-1500 cm^{-1} , atribuída às absorvâncias de proteínas. Legenda dos grupos: G = Gasolina, C = Controle; Tempo de exposição: T1 = 30min, T2 = 1h, T3 = 12h, T4 = 24h; Concentração de gasolina: C1 = 0.001%; C2 = 0.01%; C3 = 0.1%; C4 = 1.0%.



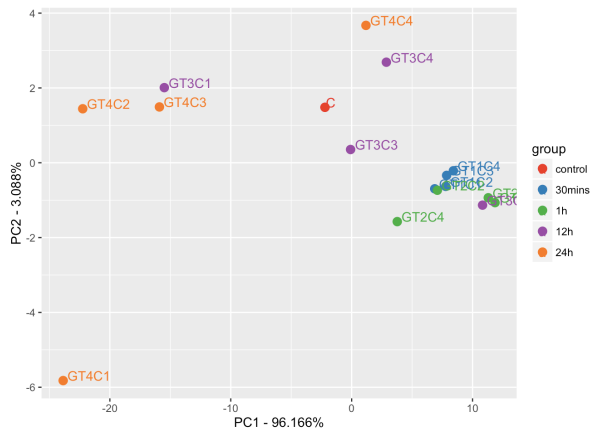
Fonte: autoria própria.

Figura 50 - Gráfico de *scores* da PCA dos espectros de FTIR dos talos de *U. lactuca* dos grupos controle e dos expostos à gasolina, após correção da linha de base (ALS). Janela de absorvância: 2900-2700 cm^{-1} , atribuída às absorvâncias de lipídios. Legenda dos grupos: G = Gasolina, C = Controle; Tempo de exposição: T1 = 30min, T2 = 1h, T3 = 12h, T4 = 24h; Concentração de gasolina: C1 = 0.001%; C2 = 0.01%; C3 = 0.1%; C4 = 1.0%.



Fonte: autoria própria.

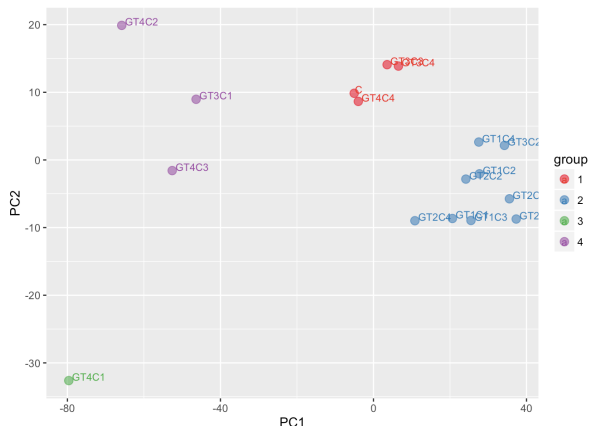
Figura 51 - Gráficos de *scores* da PCA dos espectros de FTIR dos talos de *U. lactuca* dos grupos controle e dos expostos à gasolina, após correção da linha de base (ALS). Janela de absorvância: 800-500 cm^{-1} , atribuída às absorvâncias de *fingerprint*. Legenda dos grupos: G = Gasolina, C = Controle; Tempo de exposição: T1 = 30min, T2 = 1h, T3 = 12h, T4 = 24h; Concentração de gasolina: C1 = 0.001%; C2 = 0.01%; C3 = 0.1%; C4 = 1.0%.



Fonte: autoria própria.

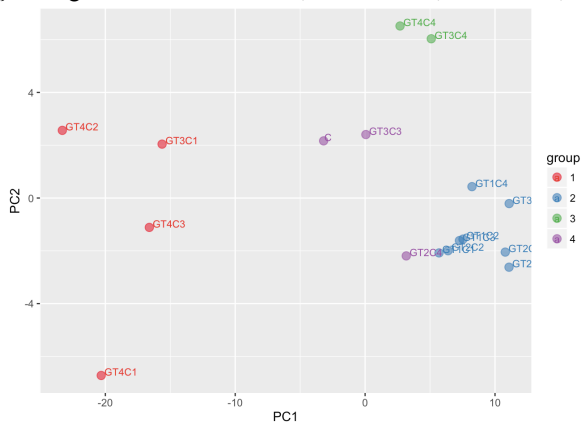
Na análise de *k-means*, os perfis metabólicos dos talos expostos à gasolina durante 30 min, 1 h, e 12 h (0,01% de gasolina) apresentaram-se semelhantes, agrupando-se em um mesmo *cluster* em quase todos os intervalos espectrais considerados (Figuras 52, 54, 55). Os perfis metabólicos dos demais grupos (controle, exposição por 12 h ou de 24 h) mostram ser distintos entre si, formando *clusters* específicos, consoante à janela espectral analisada (Figuras 52 - 56).

Figura 52 - Gráfico de agrupamentos da análise de *k-means* dos espectros de FTIR dos talos de *U. lactuca* dos grupos controle e dos expostos à gasolina, após correção da linha de base (ALS). Janela de absorvância: 4000-400 cm^{-1} . Legenda dos grupos: G = Gasolina, C = Controle; Tempo de exposição: T1 = 30min, T2 = 1h, T3 = 12h, T4 = 24h; Concentração de gasolina: C1 = 0.001%; C2 = 0.01%; C3 = 0.1%; C4 = 1.0%.



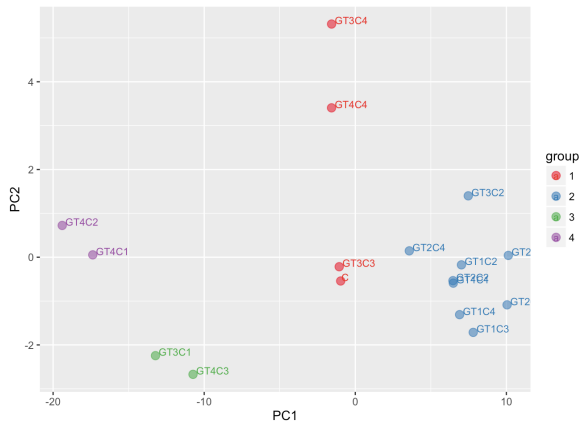
Fonte: autoria própria.

Figura 53 - Gráfico de agrupamentos da análise de *k-means* dos espectros de FTIR dos talos de *U. lactuca* dos grupos controle e dos expostos à gasolina, após correção da linha de base (ALS). Janela de absorvância: 1200-900 cm^{-1} , atribuída às absorvâncias de carboidratos. Legenda dos grupos: G = Gasolina, C = Controle; Tempo de exposição: T1 = 30min, T2 = 1h, T3 = 12h, T4 = 24h; Concentração de gasolina: C1 = 0.001%; C2 = 0.01%; C3 = 0.1%; C4 = 1.0%.



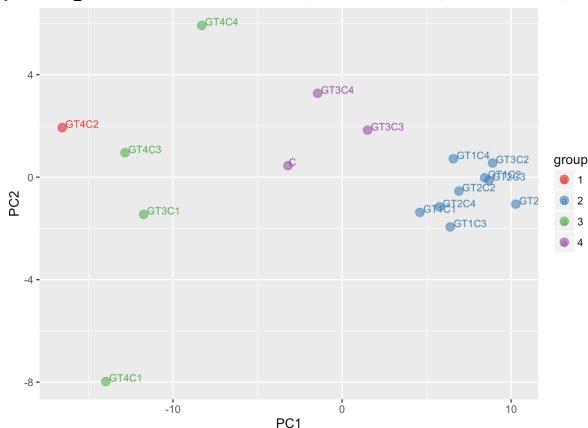
Fonte: autoria própria.

Figura 54 - Gráfico de agrupamentos da análise de *k-means* dos espectros de FTIR dos talos de *U. lactuca* dos grupos controle e dos expostos à gasolina, após correção da linha de base (ALS). Janela de absorvância: 1700-1500 cm^{-1} , atribuída às absorvâncias de proteínas. Legenda dos grupos: G = Gasolina, C = Controle; Tempo de exposição: T1 = 30min, T2 = 1h, T3 = 12h, T4 = 24h; Concentração de gasolina: C1 = 0.001%; C2 = 0.01%; C3 = 0.1%; C4 = 1.0%.



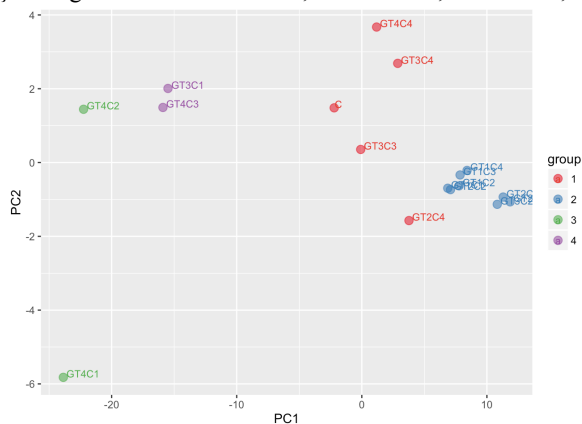
Fonte: autoria própria.

Figura 55 - Gráfico de agrupamentos da análise de *k-means* dos espectros de FTIR dos talos de *U. lactuca* dos grupos controle e dos expostos à gasolina, após correção da linha de base (ALS). Janela de absorvância: 2900-2700 cm^{-1} , atribuída às absorvâncias de lipídios. Legenda dos grupos: G = Gasolina, C = Controle; Tempo de exposição: T1 = 30min, T2 = 1h, T3 = 12h, T4 = 24h; Concentração de gasolina: C1 = 0.001%; C2 = 0.01%; C3 = 0.1%; C4 = 1.0%.



Fonte: autoria própria.

Figura 56 - Gráfico de agrupamentos da análise de *k-means* dos espectros de FTIR dos talos de *U. lactuca* dos grupos controle e dos expostos à gasolina, após correção da linha de base (ALS). Janela de absorvância: 800-500 cm^{-1} , atribuída às absorvâncias de *fingerprint*. Legenda dos grupos: G = Gasolina, C = Controle; Tempo de exposição: T1 = 30min, T2 = 1h, T3 = 12h, T4 = 24h; Concentração de gasolina: C1 = 0.001%; C2 = 0.01%; C3 = 0.1%; C4 = 1.0%.



Fonte: autoria própria.

A análise de *clusters* hierárquicos corroborou com os resultados observados nas análises de PCAs e *k-means*. A HCA do intervalo espectral total e dos intervalos referentes à região de absorvância das proteínas e dos lipídios (Figuras 57 a, c, d) apresentaram a melhor discriminação dos grupos expostos à gasolina durante 30 min e 1 h, em relação àqueles expostos por durante 12h e 24 h.

Figura 57 - Dendrogramas de HCA dos espectros de FTIR dos talos de *U. lactuca* do grupo controle e dos grupos expostos à gasolina, após transformação de transmitância para absorvância e correção da linha de base (ALS). **a)** Espectro completo ($4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$) e janelas espectrais atribuídas às absorvância de carboidratos ($1200\text{--}900\text{ cm}^{-1}$, **b**), proteínas ($1700\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$, **c**), lipídios ($3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$, **d**) e ao *fingerprint* ($800\text{--}500\text{ cm}^{-1}$, **e**). Legenda dos grupos: G = Gasolina, C = Controle; Tempo de exposição: T1 = 30min, T2 = 1h, T3 = 12h, T4 = 24h; Concentração de gasolina: C1 = 0.001%; C2 = 0.01%; C3 = 0.1%; C4 = 1.0%; Cores das folhas indicadas na legenda da figura, de acordo com o tratamento.

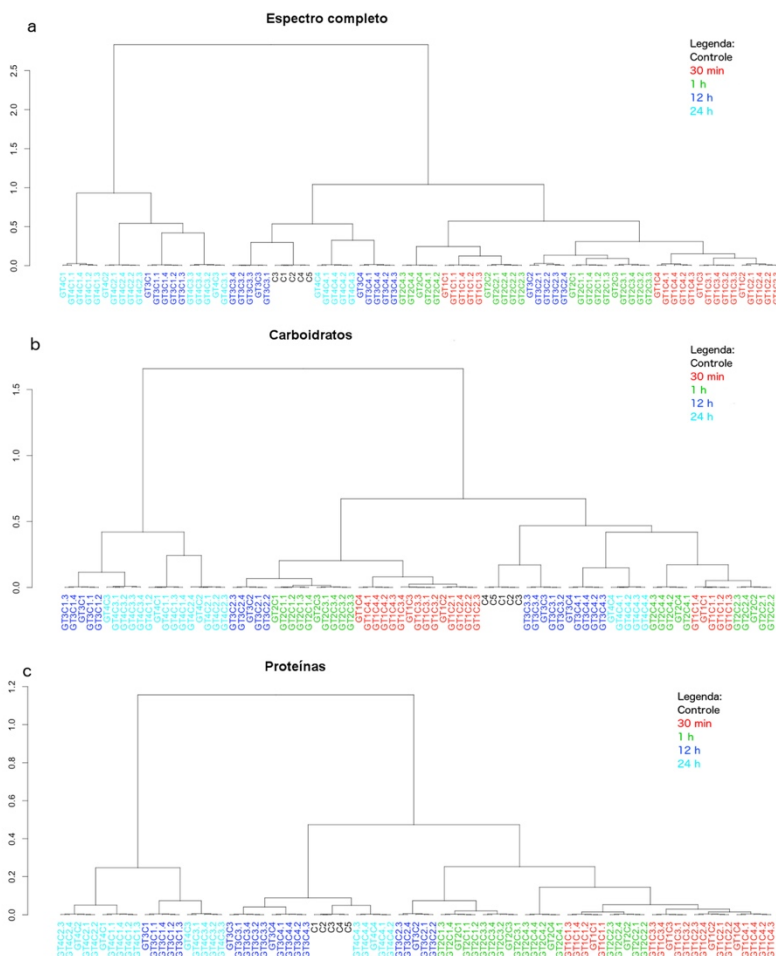
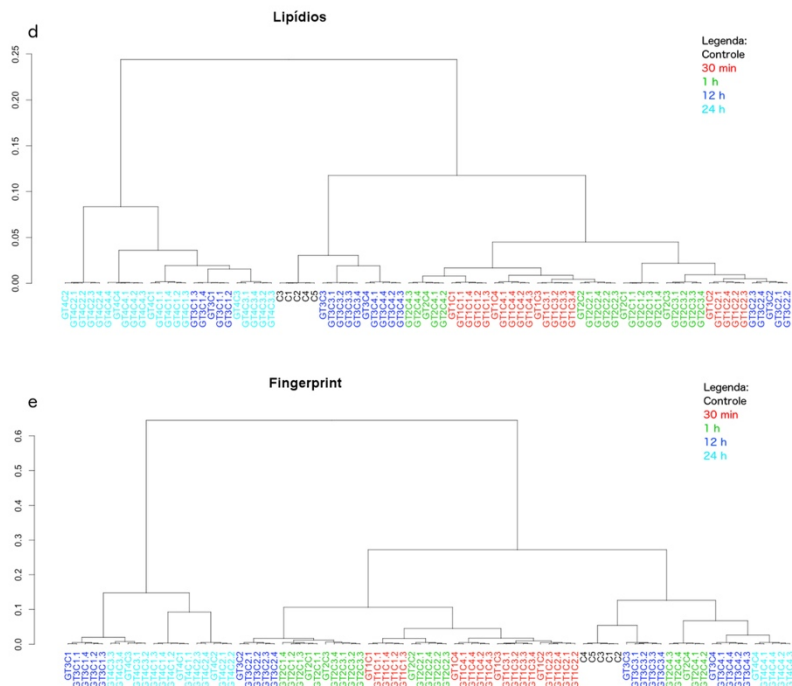


Figura 57 (Continuação)

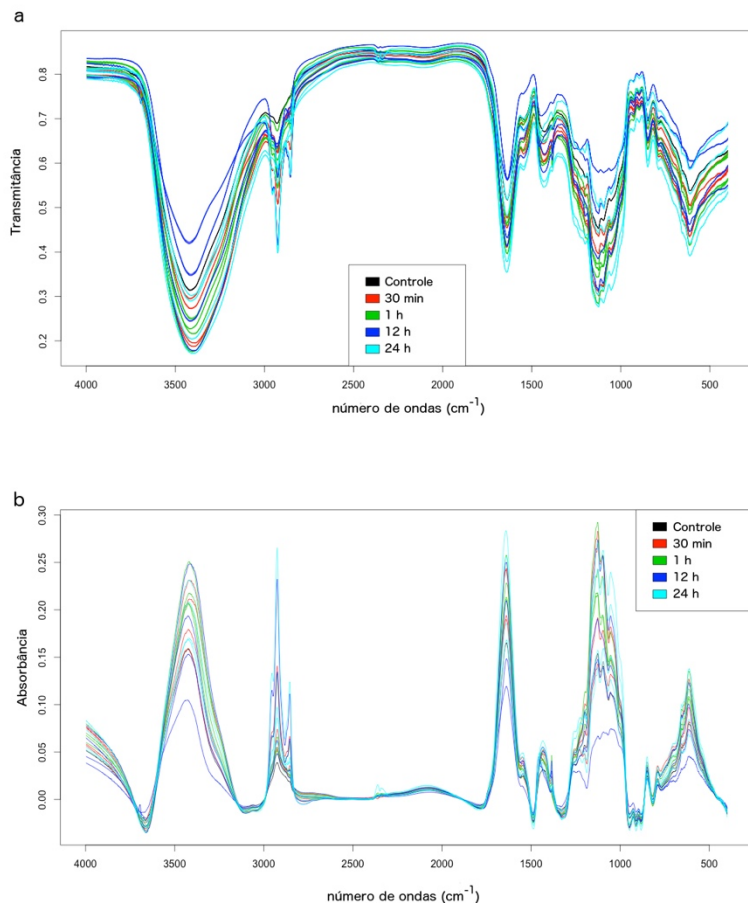


Fonte: autoria própria.

4.3.3 Análise multivariada do perfil metabólico de talos de *U. lactuca* expostos ao óleo diesel

Os procedimentos de teste e escolha das etapas de pré-tratamento e análise de dados descritos no item 4.3.2 foram realizados também para o *dataset* dos espectros de FTIR dos talos tratados com óleo diesel e do grupo controle. Nas figuras 58a e b são mostrados os perfis espectrais previamente ao pré-processamento e após este, respectivamente.

Figura 58 - Espectros de FTIR dos talos de *U. lactuca* dos grupos controle e expostos ao óleo diesel, a) sem pré-processamento; b) após transformação de transmitância para absorbância + correção da linha de base (ALS) + junção de réplicas (média). Legenda: cores dos espectros de acordo com o tempo de exposição ao diesel.



Fonte: autoria própria.

O modelo de classificação derivada das PCAs demonstrou que a concentração de óleo diesel a que os talos foram expostos influenciou seus perfis metabólicos. A tabela 9 mostra a proporção de variância individual e acumulada em PC1 e PC2, e as figuras 59 - 63 trazem os *scores* daqueles componentes principais, de acordo com as janelas

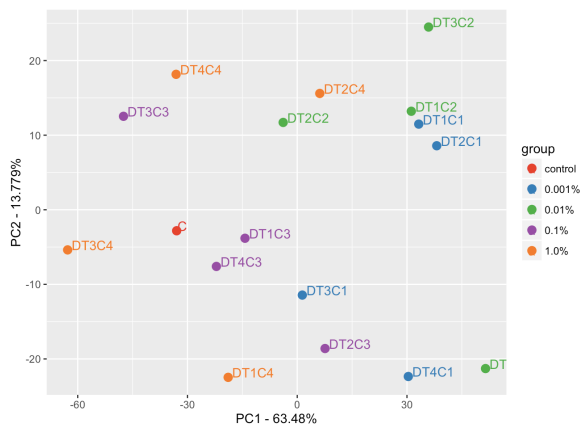
espectrais analisadas. Três grupos expostos a 0,001% e três grupos expostos a 0,01% de óleo diesel agruparam-se nos diversos *datasets* utilizados ao cálculo dos componentes principais, e.g., espectro completo de FTIR (Figura 59) e para as janelas espectrais de absorbâncias dos carboidratos (Figura 60), proteínas (Figura 61) e de *fingerprint* (Figura 63). Os perfis metabólicos dos grupos controle, DT2C2 e DT3C1 mostraram-se mais semelhantes aos dos grupos expostos a 0,1% e 1% de diesel.

Tabela 9: Resumo das análises de componentes principais dos espectros de FTIR dos talos de *U. lactuca* dos grupos controle e expostos ao óleo diesel, após transformação de transmitância para absorbância e correção da linha de base (ALS). Os dados mostrados na tabela referem-se aos *datasets* espectrais utilizados nas análises, a proporção de variância individual e acumulada em PC1 e PC2.

<i>Dataset</i> analisado	Contribuição de PC1	Contribuição de PC2	Contribuição acumulada (PC1 + PC2)
Espectro total	0,6348	0,1378	0,7726
Carboidratos	0,8523	0,1054	0,9576
Proteínas	0,8197	0,1487	0,9684
Lipídios	0,8390	0,0884	0,9274
<i>Fingerprint</i>	0,8688	0,1144	0,9832

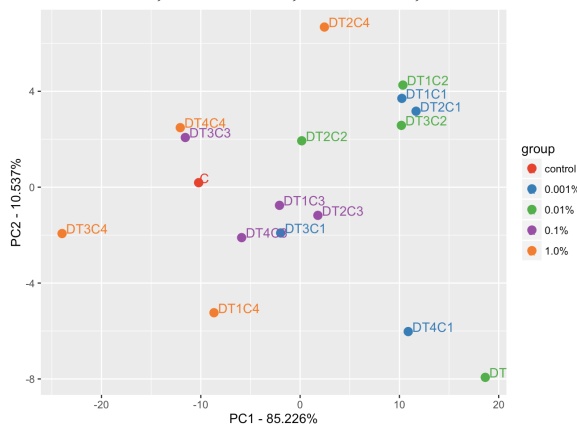
Fonte: autoria própria.

Figura 59 - Gráfico de *scores* da PCA dos espectros de FTIR dos talos de *U. lactuca* dos grupos controle e dos expostos à gasolina, após correção da linha de base (ALS). Janela de absorvância: 4000-400 cm^{-1} . Legenda dos grupos: D = Diesel, C = Controle; Tempo de exposição: T1 = 30min, T2 = 1h, T3 = 12h, T4 = 24h; Concentração de gasolina: C1 = 0.001%; C2 = 0.01%; C3 = 0.1%; C4 = 1.0%.



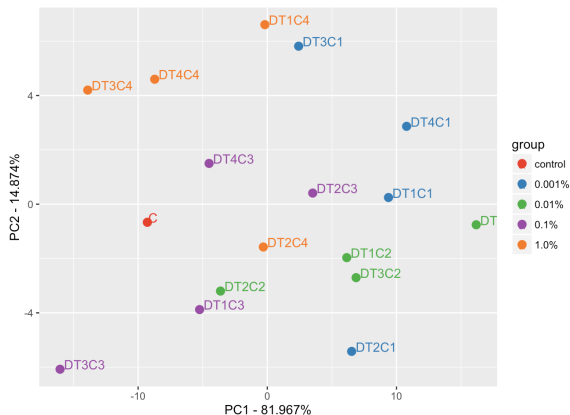
Fonte: autoria própria.

Figura 60 - Gráfico de *scores* da PCA dos espectros de FTIR dos talos de *U. lactuca* dos grupos controle e dos expostos ao óleo diesel, após correção da linha de base (ALS). Janela de absorvância: 1200-900 cm^{-1} , atribuída às absorvâncias de carboidratos. Legenda dos grupos: D = Diesel, C = Controle; Tempo de exposição: T1 = 30min, T2 = 1h, T3 = 12h, T4 = 24h; Concentração de gasolina: C1 = 0.001%; C2 = 0.01%; C3 = 0.1%; C4 = 1.0%.



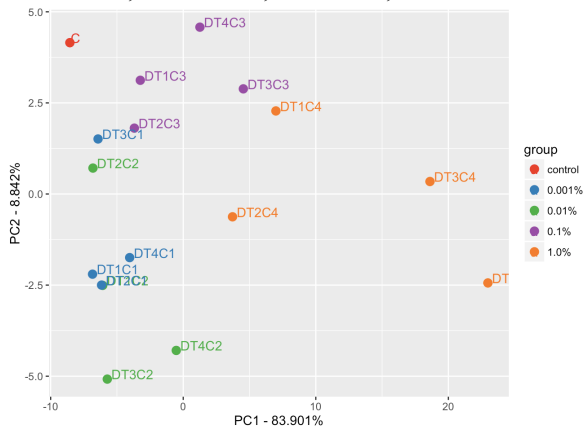
Fonte: autoria própria.

Figura 61 - Gráfico de *scores* da PCA dos espectros de FTIR dos talos de *U. lactuca* dos grupos controle e dos expostos ao óleo diesel, após correção da linha de base (ALS). Janela de absorvância: 1700-1500 cm^{-1} , atribuída às absorvâncias de proteínas. Legenda dos grupos: D = Diesel, C = Controle; Tempo de exposição: T1 = 30min, T2 = 1h, T3 = 12h, T4 = 24h; Concentração de gasolina: C1 = 0.001%; C2 = 0.01%; C3 = 0.1%; C4 = 1.0%.



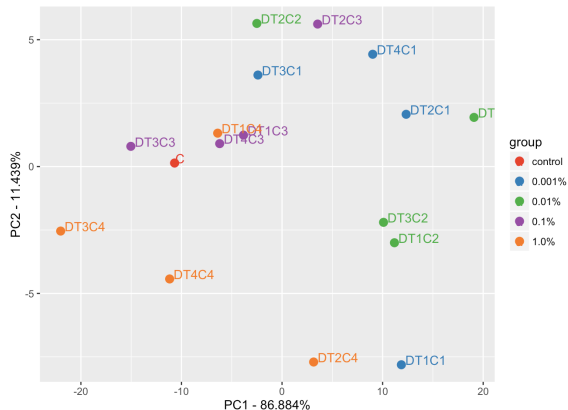
Fonte: autoria própria.

Figura 62 - Gráfico de *scores* da PCA dos espectros de FTIR dos talos de *U. lactuca* dos grupos controle e dos expostos ao óleo diesel, após correção da linha de base (ALS). Janela de absorvância: 2900-2700 cm^{-1} , atribuída às absorvâncias de lipídios. Legenda dos grupos: D = Diesel, C = Controle; Tempo de exposição: T1 = 30min, T2 = 1h, T3 = 12h, T4 = 24h; Concentração de gasolina: C1 = 0.001%; C2 = 0.01%; C3 = 0.1%; C4 = 1.0%.



Fonte: autoria própria.

Figura 63 - Gráficos de *scores* da PCA dos espectros de FTIR dos talos de *U. lactuca* dos grupos controle e dos expostos ao óleo diesel, após correção da linha de base (ALS). Janela de absorvância: 800-500 cm^{-1} , atribuída às absorvâncias de *fingerprint*. Legenda dos grupos: D = Diesel, C = Controle; Tempo de exposição: T1 = 30min, T2 = 1h, T3 = 12h, T4 = 24h; Concentração de gasolina: C1 = 0.001%; C2 = 0.01%; C3 = 0.1%; C4 = 1.0%.



Fonte: autoria própria.

Os resultados das análises de *k-means* (Figuras 64 - 68) sugerem que os *scores* dos grupos em PC1 influenciaram os *clusters* formados por estas análises, porém esta análise não foi capaz de agrupar as amostras de acordo com o tempo de exposição ou a concentração de diesel a que as amostras foram expostas.

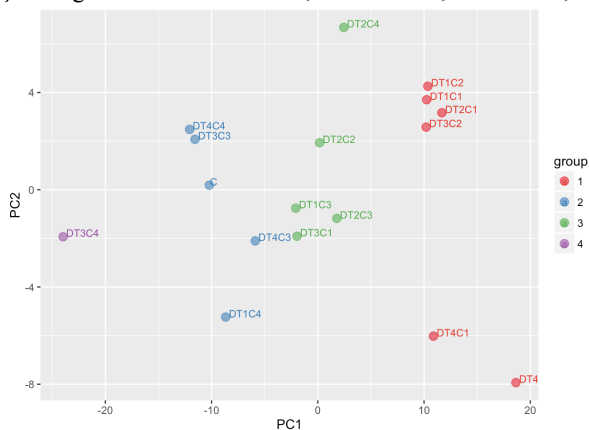
A análise de *clusters* hierárquicos do *dataset* de FTIR completo (4000 - 400 cm^{-1}) agrupou as amostras de forma semelhante à observada nas PCAs (Figura 69a). Os grupos expostos a 0,001% ou 0,01% de óleo diesel agruparam-se, assim como as amostras expostas a 0,1% e 1,0% também compartilharam a mesma vizinhança. De forma semelhante, agrupamentos foram observados nas HCAs dos dados referentes aos intervalos de absorvâncias de carboidratos e de proteínas (Figura 69b, c, respectivamente).

Figura 64 - Gráfico de agrupamentos da análise de *k-means* dos espectros de FTIR dos talos de *U. lactuca* dos grupos controle e dos expostos ao óleo diesel, após correção da linha de base (ALS). Janela de absorvância: 4000-400 cm^{-1} . Legenda dos grupos: D = Diesel, C = Controle; Tempo de exposição: T1 = 30min, T2 = 1h, T3 = 12h, T4 = 24h; Concentração de gasolina: C1 = 0.001%; C2 = 0.01%; C3 = 0.1%; C4 = 1.0%.



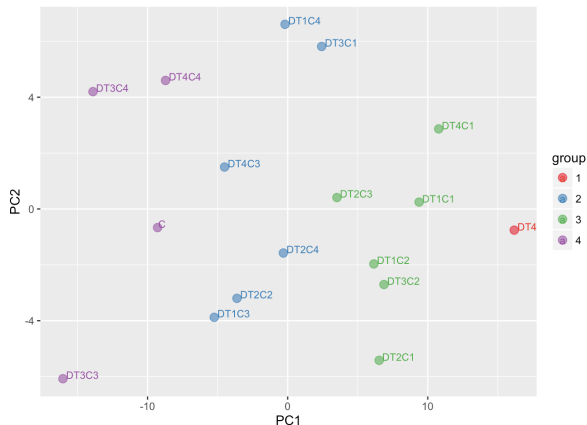
Fonte: autoria própria.

Figura 65 - Gráfico de agrupamentos da análise de *k-means* dos espectros de FTIR dos talos de *U. lactuca* dos grupos controle e dos expostos ao óleo diesel, após correção da linha de base (ALS). Janela de absorvância: 1200-900 cm^{-1} , atribuída às absorvâncias de carboidratos. Legenda dos grupos: D = Diesel, C = Controle; Tempo de exposição: T1 = 30min, T2 = 1h, T3 = 12h, T4 = 24h; Concentração de gasolina: C1 = 0.001%; C2 = 0.01%; C3 = 0.1%; C4 = 1.0%.



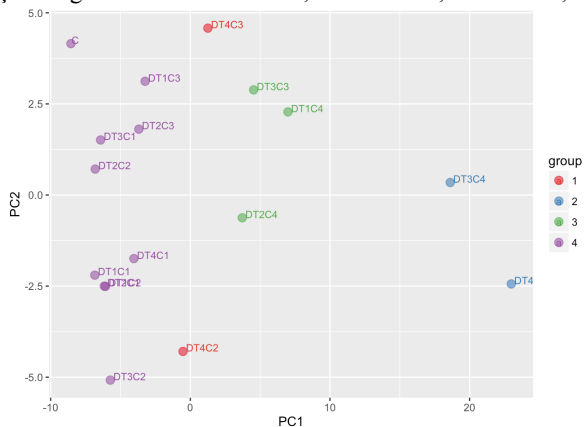
Fonte: autoria própria.

Figura 66 - Gráfico de agrupamentos da análise de *k-means* dos espectros de FTIR dos talos de *U. lactuca* dos grupos controle e dos expostos ao óleo diesel, após correção da linha de base (ALS). Janela de absorvância: 1700-1500 cm^{-1} , atribuída às absorvâncias de proteínas. Legenda dos grupos: D = Diesel, C = Controle; Tempo de exposição: T1 = 30min, T2 = 1h, T3 = 12h, T4 = 24h; Concentração de gasolina: C1 = 0.001%; C2 = 0.01%; C3 = 0.1%; C4 = 1.0%.



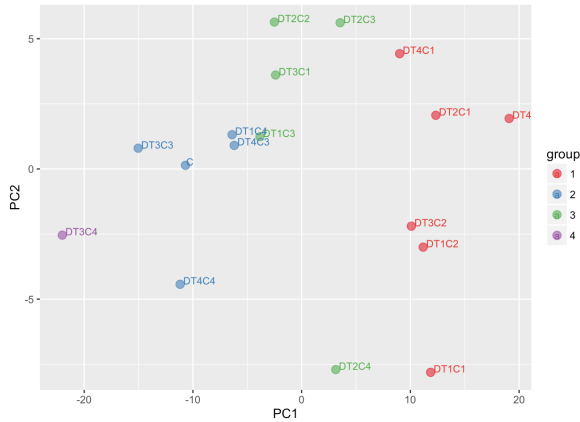
Fonte: autoria própria.

Figura 67 - Gráfico de agrupamentos da análise de *k-means* dos espectros de FTIR dos talos de *U. lactuca* dos grupos controle e dos expostos ao óleo diesel, após correção da linha de base (ALS). Janela de absorvância: 2900-2700 cm^{-1} , atribuída às absorvâncias de lipídios. Legenda dos grupos: D = Diesel, C = Controle; Tempo de exposição: T1 = 30min, T2 = 1h, T3 = 12h, T4 = 24h; Concentração de gasolina: C1 = 0.001%; C2 = 0.01%; C3 = 0.1%; C4 = 1.0%.



Fonte: autoria própria.

Figura 68 - Gráfico de agrupamentos da análise de *k-means* dos espectros de FTIR dos talos de *U. lactuca* dos grupos controle e dos expostos ao óleo diesel, após correção da linha de base (ALS). Janela de absorvância: 800-500 cm^{-1} , atribuída às absorvâncias de *fingerprint*. Legenda dos grupos: D = Diesel, C = Controle; Tempo de exposição: T1 = 30min, T2 = 1h, T3 = 12h, T4 = 24h; Concentração de gasolina: C1 = 0.001%; C2 = 0.01%; C3 = 0.1%; C4 = 1.0%.



Fonte: autoria própria.

Figura 69 - Dendrogramas de HCA dos espectros de FTIR dos talos de *U. lactuca* do grupo controle e dos grupos expostos ao óleo diesel, após transformação de transmitância para absorvância e correção da linha de base (ALS). Espectro completo (4000-400 cm^{-1}) e janelas espectrais atribuídas às absorvância de carboidratos (1200-900 cm^{-1} , **b**), proteínas (1700-1500 cm^{-1} , **c**), lipídios (3000-2800 cm^{-1} , **d**) e ao *fingerprint* (800-500 cm^{-1} , **e**). Legenda dos grupos: D = Diesel, C = Controle; Tempo de exposição: T1 = 30min, T2 = 1h, T3 = 12h, T4 = 24h; Concentração de óleo diesel: C1 = 0.001%; C2 = 0.01%; C3 = 0.1%; C4 = 1.0%; Cores das folhas indicadas na legenda da figura, de acordo com o tratamento.

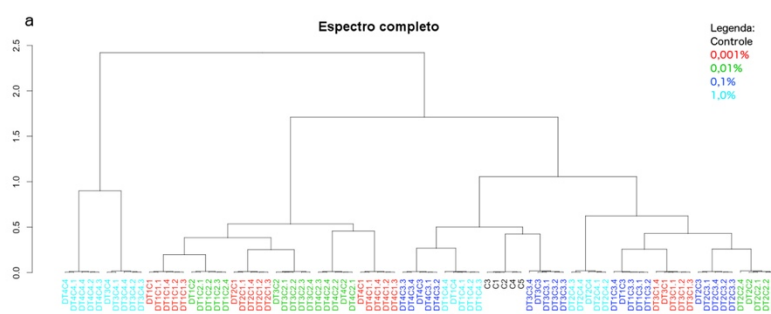
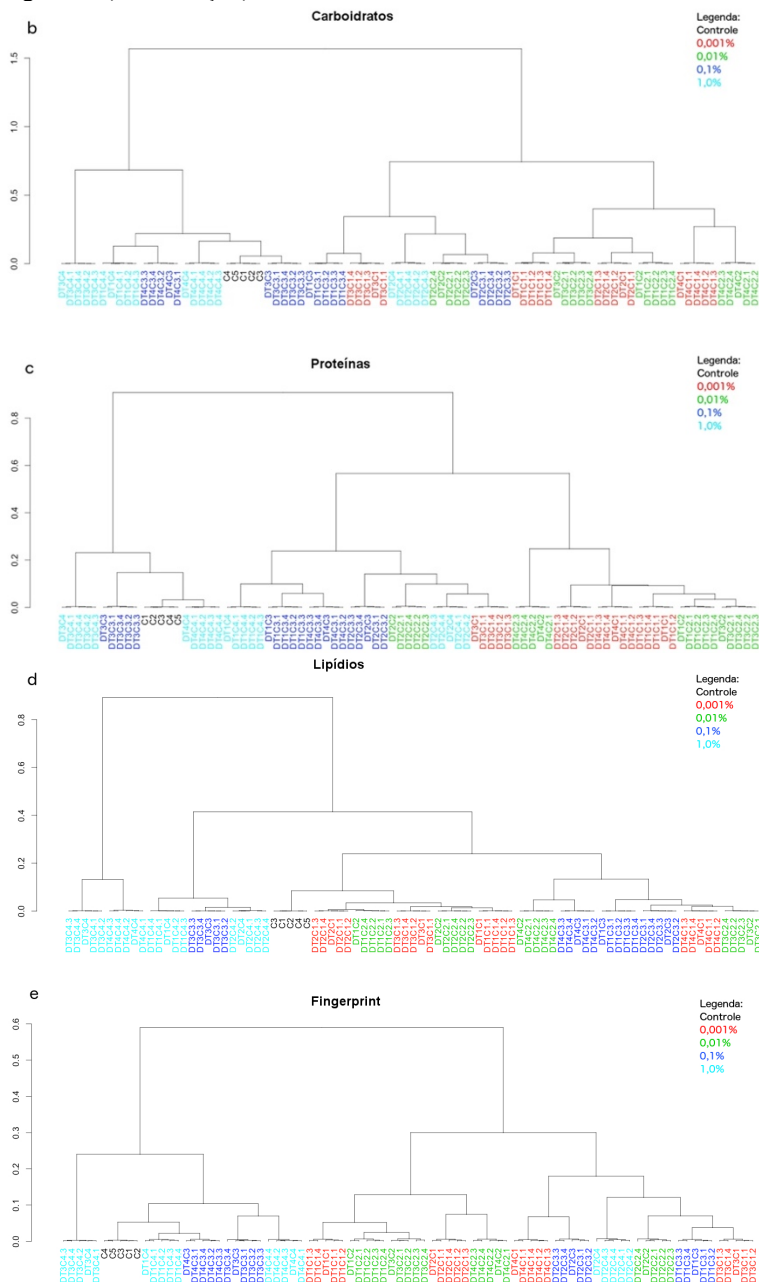


Figura 69 (Continuação)



Fonte: autoria própria.

4.4 DISCUSSÃO

As principais funções dos polissacarídeos da parede celular são a regulação osmótica e iônica e a proteção mecânica contra a ação das ondas e a dessecação ocasionada pela variação de marés (LAHAYE E ROBIC, 2007; KLOAREG E QUATRANO, 1988). A alteração drástica observada na textura da mucilagem após a exposição ao óleo diesel e à gasolina pode resultar da adsorção dos hidrocarbonetos dos combustíveis à mucilagem, ou ainda do aumento de secreção dos polissacarídeos sulfatados como forma de defesa física contra a entrada dos hidrocarbonetos do diesel e da gasolina. Tanto a primeira hipótese quanto a segunda foram reações observadas *in situ* em diversas espécies de algas, após acidentes de derramamento de petróleo (O'BRIEN E DIXON, 1976). O espessamento da parede celular também foi observado em *H. musciformis* (Rhodophyta) exposta ao óleo diesel (RAMLOV *et al.*, 2013), sendo um mecanismo de proteção utilizado por *Ulva* sp., *H. musciformis*, *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie, *Kappaphycus avvarezii* (Doty) Doty ex P. C. Silva à contaminação por Se, Cd, Pb e Cu e contra a radiação UVB (SCHIAVON *et al.*, 2012; BOUZON *et al.*, 2012; GOUVEIA *et al.*, 2013; SCHMIDT *et al.*, 2009; SCHMIDT *et al.*, 2010; SCHMIDT *et al.*, 2012).

De acordo com BAKER (1970), O'BRIEN E DIXON (1976), os danos mais severos do petróleo e seus derivados às algas estão relacionados à integridade das membranas. A alta apolaridade dos hidrocarbonetos aromáticos permite sua difusão através das membranas celulares e o acúmulo dentro dos compartimentos celulares. Além disso, o caráter lipofílico de tais compostos permite que eles interajam e ocupem espaços na estrutura das membranas, deslocando e afastando componentes como enzimas e pigmentos, i.e. clorofilas e carotenoides, levando ao desacoplamento de complexos enzimáticos de vias fundamentais, e.g., respiração e fotossíntese. Estudos realizados por NECHEV *et al.* (2002) demonstram a alteração do perfil lipídico de *U. rigida* após exposição ao óleo diesel. O conteúdo total de lipídios aumentou, evidenciando o acúmulo de hidrocarbonetos do diesel na célula, enquanto a quantidade de triacilgliceróis diminuiu. De outra forma, os teores de glicolipídios e fosfolipídios aumentaram. Este cenário resultou em mudanças na permeabilidade celular, provavelmente como forma de proteção à entrada daquele xenobiótico na célula. Por causa da grande quantidade de enzimas localizadas nas membranas tilacoidais, é possível deduzir através da técnica citoquímica de CBB uma desorganização das membranas de *U. lactuca* após

exposição à gasolina, provavelmente resultante da grande quantidade de hidrocarbonetos aromáticos e etanol em sua composição. Por outro lado, os hidrocarbonetos alifáticos do diesel parecem ter causado danos menos intensos após 30 min de exposição, possivelmente pela dificuldade das longas cadeias carbônicas atravessarem a parede celular e as membranas, sendo que tais danos puderam ser recuperados ao longo das demais horas a que os talos ficaram expostos.

A redução no conteúdo de clorofilas foi reportada em *U. lactuca* exposta a cádmio e cobre, em *H. musciformis* exposta ao óleo diesel, e em *Hydrilla verticillata* (L. f.) Royle exposta a tolueno, xileno e etilbenzeno; tendo sido associada aos efeitos deletérios destes xenobióticos (HAN, 2008; KUMAR *et al.*, 2010; YAN E ZHOU, 2011; RAMLOV *et al.*, 2013). Entretanto, os conteúdos de clorofilas *a* e *b* observados em *U. lactuca* exposta ao óleo diesel e à gasolina mostraram-se variáveis, sem que um padrão quantitativo pudesse ser associado ao tempo de exposição ou à concentração destes combustíveis na água. O mesmo foi observado em relação ao perfil de carotenoides após a exposição ao óleo diesel. De outra forma, estes pigmentos sofreram redução nos talos expostos à gasolina. Estes resultados indicam que os pigmentos fotossintetizantes de *U. lactuca* são resistentes às injúrias da exposição aguda aos combustíveis estudados e suas rotas biossintéticas são pouco afetadas, à exceção dos carotenóides em talos expostos à gasolina. Dada a importância destes pigmentos no metabolismo vegetal, é esperado que eles sejam capazes de suportar certo nível de danos. Além de atuarem na captação da energia luminosa na fotossíntese, os carotenoides estabilizam a fase lipídica das membranas dos tilacoides, o que contribui para preservar a funcionalidade da maquinaria fotossintética (FRANK E COGDELL, 1996; HAVAUX, 1998). KORTE *et al.* (2000) confirmaram a resistência estrutural dos cloroplastos aos danos provocados por hidrocarbonetos aromáticos, demonstrando que estas organelas foram as últimas a apresentar sinais de desorganização ultraestrutural. Dessa forma, é possível supor que os carotenoides protejam estruturalmente os fotossistemas contra os danos da exposição ao óleo diesel em *U. lactuca*. Apesar disso, não se pode afirmar que a incorporação dos hidrocarbonetos dos derivados de petróleo e sua interação com as membranas não tenham afetado a fotossíntese ou a respiração em alguma extensão.

Os carotenoides também têm importante papel na defesa não-enzimática contra danos oxidativos, juntamente com os polifenóis, que são sintetizados pelas plantas em resposta à pressão ecológica ou fisiológica (KHODDAMI *et al.*, 2013; PETRUSSA *et al.*, 2013). O

aumento nos conteúdos de carotenoides e polifenóis já foi associado ao estresse oxidativo induzido por selênio e por cádmio em *U. lactuca*, e por tolueno em *H. verticillata* (KUMAR *et al.*, 2010; YAN E ZHOU, 2011; SCHIAVON *et al.*, 2012). Entretanto, no presente estudo a exposição ao óleo diesel e à gasolina determinou redução nos conteúdos de polifenóis. A partir destes dados, pode-se sugerir que a via biossintética destes compostos tenha sido desacoplada em decorrência dos danos às membranas ou que as células dão preferência a outras rotas para metabolizar os xenobióticos. Deve se considerar também a atividade de enzimas antioxidantes no combate aos danos oxidativos, como a superóxido dismutase (SOD), que não foram avaliadas neste trabalho. A depleção de polifenóis observada pode servir como biomarcador deste tipo de poluição em programas de biomonitoramento com esta espécie.

A correlação positiva entre os conteúdos de açúcares solúveis e de amido e o tempo de exposição à gasolina, assim como o aumento nos conteúdos destes metabólitos após 12 h de exposição ao óleo diesel, seguido de uma redução após 24 h de exposição a este derivado de petróleo, sugerem que a detoxificação dos hidrocarbonetos envolve as vias energéticas de *U. lactuca*. De acordo com KORTE *et al.* (2000), as etapas iniciais no metabolismo de hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos em plantas incluem hidroxilação e glicosilação, seguidas da oxidação dos compostos, com formação de dióxido de carbono, ácidos carboxílicos e aminoácidos, entre outros. Ainda de acordo com aqueles autores, o acúmulo de amido em cloroplastos foi reportado em folhas de milho expostas a diversos alcanos. É possível que o aumento dos açúcares solúveis e de amido observado seja decorrente da alocação dos carbonos oriundos do diesel e da gasolina após sua metabolização. De interesse, ressalta-se que culturas de *Desmodemus armatus* (Chodat) E. Hegewald expostas ao óleo diesel e à gasolina exibiram redução nos conteúdos de clorofilas e carotenoides, mas continuaram crescendo por 9 dias, o que foi creditado à assimilação dos hidrocarbonetos como fonte de carbono ao metabolismo da microalga (KUREYSHEVICH E GUSEYNOVA, 2008). Similarmente, tal capacidade também foi reportada nas microalgas verdes *Chlorella vulgaris* Beyerinck [Beijerinck], *Scenedesmus platydiscus* (G. M. Smith) Chodat, *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Brébisson e *Selenastrum capricornutum* Printz (HARITASH E KAUSHIK, 2009). Não se pode excluir, entretanto, a participação da microbiota associada a este gênero na metabolização dos hidrocarbonetos. A simbiose com bactérias já se mostrou fundamental para a organização do talo de *Ulva* e foi relacionada também à inibição do crescimento de organismos

incrustantes na superfície dos talos de *U. australis* (RAO *et al.* 2006; WICHARD *et al.*, 2015). A importância deste consórcio no processo de degradação e metabolização de xenobióticos, em especial os hidrocarbonetos, é um campo a ser explorado.

O aumento no conteúdo de açúcares solúveis detectado nos talos expostos ao óleo diesel e à gasolina abre ainda outro ponto a ser investigado. Além de constituir uma fonte energética, os açúcares solúveis auxiliam na osmorregulação celular e são utilizados em vias oxidativas, como a via das Pentoses-fosfato, levando à produção de NADPH, que contribui para o sequestro de espécies reativas de oxigênio, reduzindo os danos oxidativos nas células (COUÉE *et al.*, 2006). Desta forma, será de grande relevância investigar se esta via metabólica está atuando como linha de defesa em lugar da proteção antioxidante pelos polifenóis e carotenóides.

Em relação à análise multivariada dos dados de quantificação bioquímica, as análises de PCA e HCA apenas reiteraram o que pôde ser observado nas análises univariadas. Os grupos expostos à gasolina durante 12 h e 24 h e os grupos expostos ao óleo diesel durante 12 h claramente discriminaram-se dos demais grupos, evidenciando a influência dos conteúdos de açúcares solúveis e amido em ambos os casos.

A análise do *fingerprint* metabólico, utilizando a espectroscopia de infravermelho, possibilitou um olhar global das principais classes metabólicas e, com isso, uma percepção mais precisa do *status* metabólico dos grupos expostos aos derivados de petróleo. As PCAs resultaram em altas percentagens de variância explicadas em PC1, quer para o *dataset* completo, ou para os *datasets* de gasolina ou de óleo diesel quando analisados separadamente.

As análises de PCA, *k-means* e de *cluster* hierárquico permitiram discriminar a maioria dos perfis metabólicos de acordo com o xenobiótico a que foram expostos os talos. Estas análises revelaram também que o fator tempo de exposição foi mais relevante na resposta metabólica à gasolina comparativamente à concentração daquele xenobiótico. A análise de *clustering* hierárquicos dos dados espectroscópicos das janelas atribuídas às absorbâncias de proteínas e de lipídios revelou que estas classes de metabólitos contribuem de forma importante ao *fingerprint* metabólico dos grupos em questão, podendo ser utilizados isoladamente para diferenciar as amostras, além de apontar direção para futuras investigações de metabólitos-alvo e vias metabólicas. Por outro lado, o fator concentração gerou a melhor discriminação dos grupos expostos ao óleo diesel, apontando diferenças relevantes no que diz respeito à resposta metabólica de *U. lactuca* aos

dois xenobióticos, que constituem um interessante campo para futuras pesquisas.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a exposição aguda de *U. lactuca* ao óleo diesel e à gasolina provocam respostas bioquímicas e alterações em sua morfologia, ultraestrutura e perfil metabólico. A exposição aos xenobióticos causou alterações na mucilagem dos talos e na morfologia do citoplasma, observados por MEV e citoquímica com CBB, respectivamente. As células responderam também à exposição ao óleo diesel com redução do conteúdo de polifenóis e aumento dos conteúdos de açúcares solúveis e amido. A exposição dos talos à gasolina provocou redução nos conteúdos de carotenoides e polifenóis e aumento nos conteúdos de açúcares solúveis e amido correlacionados ao tempo de exposição. Alterações peculiares nos perfis metabólicos dos talos consoante aos xenobióticos em estudo foram detectadas via análise multivariada, sendo que a análise de *clustering* hierárquicos retornou os melhores resultados. É possível ainda discriminar os perfis de talos expostos ao óleo diesel de acordo com a concentração deste derivado e os perfis de talos expostos à gasolina de acordo com o tempo de exposição ao xenobiótico.

Ulva lactuca é considerada uma espécie tolerante a uma ampla gama de estressores ambientais, inclusive metais pesados (HAN, 2008), e os resultados aqui descritos demonstraram que tal resistência também associada aos efeitos tóxicos dos hidrocarbonetos presentes no óleo diesel, tendo sido observado que a espécie é mais suscetível à toxicidade da gasolina.

Os resultados demonstraram que *Ulva lactuca* é uma boa candidata para uso como fitorremediadora de ambientes contaminados por derivados de petróleo. Além disso, a análise bioquímica dos conteúdos de polifenóis, açúcares solúveis e amido, em conjunto com a análise citoquímica com CBB dos talos da macroalga podem servir como marcadores da poluição causada por gasolina, óleo diesel e outros derivados de petróleo em programas de biomonitoramento. Os resultados deste trabalho demonstraram ainda que a técnica de FTIR, associada à análise multivariada de dados, é uma metodologia simples, barata e eficiente para a classificação de amostras. Embora o uso desta técnica analítica ainda não esteja disseminado na área da metabolômica ambiental (vide sessão 2.4.2), a metodologia utilizada neste trabalho apresenta potencial para novas contribuições neste campo de pesquisa.

REFERÊNCIAS

ARNOLD, W. *et al.* Gefiertro und einbsttung in glycolmethacrylat (GMA)-Ergebnisse Histochemischer Reaktionen. **Acta Histochem.**, v. 14, p. 271-277. 1975.

ARNON, D. I. Copper enzyme in isolated chloroplast. **Plant Physiol.**, v. 24, p. 1-15. 1949.

BAKER, J.M. The effects of oils on plants. **Environ. Pollut.**, v. 1, p. 27-44. 1970. doi:10.1016/0013-9327(70)90004-2

BÖLLING, C.; FIEHN, O. Metabolite profiling of *Chlamydomonas reinhardtii* under nutrient deprivation. **Plant Physiol.**, v. 139, p. 1995–2005. 2005.

BOUZON, Z. L. **Aspectos histoquímicos e ultraestruturais da porção vegetativa e reprodutiva de estiquídios de *Hypnea musciformis* (Gigartinales- Rhodophyta)**. 1993. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR, 1993.

BOUZON, Z.L. *et al.* Influences of cadmium on fine structure and metabolism of *Hypnea musciformis* (Rhodophyta, Gigartinales) cultivated in vitro. **Protoplasma**, v. 249, p. 637–650. 2012. doi:10.1007/s00709-011-0301-6

BRASIL. Agência Nacional Do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Resolução n. 40, de 25 de outubro de 2013**. Disponível em: <<http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll?f=templates&fn=default.htm&vid=anp:10.1048/enu>>. Acesso em 12 de maio de 2016.

BRASIL. Conselho Interministerial do Açúcar e do Alcool. **Decreto n. 1, de 4 de março de 2015**. Disponível em: <www.anp.gov.br/?dw=74502>. Acesso em 12 de maio de 2016.

BRITO, L. V. R. *et al.* Levantamento taxonômico das macroalgas da zona das marés de costões rochosos adjacentes ao terminal marítimo

Almirante Maximiano Fonseca, Baía da Ilha Grande, RJ. **Atlântica**, v. 24, p. 17-26. 2002.

BUNDY, J.G. *et al.* Environmental metabolomics: A critical review and future perspectives. **Metabolomics**, v. 5, p. 3 - 21. 2009. doi:10.1007/s11306-008-0152-0

CARAFA, R. *et al.* A bioaccumulation model for herbicides in *Ulva rigida* and *Tapes philippinarum* in Sacca di Goro lagoon (Northern Adriatic). **Chemosphere**, v. 74, p. 1044-1052, 2009. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.10.058

CASALE, M. *et al.* NIR spectroscopy as a tool for discriminating between lichens exposed to air pollution. **Chemosphere**, v. 134, p. 355–60. 2015. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.03.095

CASTILLA, J.C. Copper mine tailing disposal in northern chile rocky shores: *Enteromorpha compressa* (Chlorophyta) as a sentinel species. **Environ. Monit. Assess.**, v. 40, p. 171–184. 1996. doi:10.1007/BF00414390

CHAKRABORTY, S. *et al.* Benthic macroalgae as biological indicators of heavy metal pollution in the marine environments: A biomonitoring approach for pollution assessment. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 100, p. 61-68. 2014. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.12.003

COUÉE, I. *et al.* Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. **J. Exp. Bot.**, v. 57, p. 449-459. 2006. doi:10.1093/jxb/erj027

CRONODON. **Algae - building bodies from balls, chains, sheets and tubes**. Disponível em: <http://cronodon.com/BioTech/Algal_Bodies.html>. Acesso em: 01 de março de 2014.

DUBIS, E.N. *et al.* Comparative analysis of plant cuticular waxes using HATR FT-IR reflection technique. **J. Mol. Struct.**, v. 511-512, p. 173–179. 1999. doi:10.1016/S0022-2860(99)00157-X

DUNN, W.B.; ELLIS, D.I. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. **TrAC - Trends Anal. Chem.**, v. 24, p. 285–294. 2005. doi:10.1016/j.trac.2004.11.021

EASTON, C. *et al.* An evaluation of the toxicity and bioaccumulation of cisplatin in the marine environment using the macroalga, *Ulva lactuca*. **Environ. Pollut.**, v. 159, p. 3504-3508. 2011. doi:10.1016/j.envpol.2011.08.018

EDWARDS, P. Illustrated guide to the seaweeds and sea grasses in the vicinity of Porto Aransas, Texas. **Contribution in Marine Science**. Austin, v. 15, p. 1-228. 1970.

EKLUND, B. A 7-day reproduction test with the marine red alga *Ceramium strictum*. In: SLOOFF, W., DEKRUIJF, H. (Eds.). **The Science of the Total Environment Proceedings from Second European Conference on Ecotoxicology, Supplement**. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, p. 749-759. 1993.

EKLUND, B., Reproductive performance and growth response of the red alga *Ceramium strictum* under the impact of phenol. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 167, p. 119-126. 1998.

EKLUND, B. T.; KAUTSKY, L. Review on toxicity testing with marine macroalgae and the need for method standardization - Exemplified with copper and phenol. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 46, p. 171-181. 2003. doi:10.1016/S0025-326X(02)00225-4

FIEHN, O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. **Comp. Funct. Genomics**, v. 2, p. 155-168. 2001. doi:10.1002/cfg.82

FRANK, H. A.; COGDELL, R. J. Carotenoids in Photosynthesis. **Photochem. Photobiol.**, v. 63, p. 257-264. 1996. doi:10.1351/pac198557050723

FUKUSAKI, E., KOBAYASHI, A. Plant metabolomics: potential for practical operation. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 100, p. 347-354. 2005. doi:10.1263/jbb.100.347

GAHAN, P. B. **Plant histochemistry and cytochemistry: an introduction**. London: Academic Press. 1984. 301 pp.

GERHARDT, A. Bioindicator species and their use in biomonitoring. In: **Environmental Monitoring - vol. 1**. INYANG, H. I.; DANIELS, J. L. (Ed.) Oxford: Eolss Publishers/ UNESCO. 2009. 476 pp.

GIDMAN, E. *et al.* Investigating plant-plant interference by metabolic fingerprinting. **Phytochemistry**, v. 63, p. 705–710. 2003.
doi:10.1016/S0031-9422(03)00288-7

GOOGLE MAPAS. Disponível em:
<<http://www.google.com.br/maps>>. Acesso em: 01 de março de 2016.

GORDON, E. M.; MCCANDLESS, E. L. Ultrastructure and histochemistry of *Chondrus crispus* Stackhouse. **Proc. Nova. Scot. Inst. Sci.**, v. 27, p. 111-133. 1973.

GOUVEIA, C. *et al.* The Effects of Lead and Copper on the Cellular Architecture and Metabolism of the Red Alga *Gracilaria domingensis*. **Microsc. Microanal.**, v. 19, p. 513-524. 2013.
doi:10.1017/S1431927613000317

GOUVINHAS, I. *et al.* Discrimination and characterisation of extra virgin olive oils from three cultivars in different maturation stages using Fourier transform infrared spectroscopy in tandem with chemometrics. **Food Chem.**, v. 174, p. 226–232. 2015.
doi:10.1016/j.foodchem.2014.11.037

GRAHAM, L. E., GRAHAM, J, WILCOX, L. W. **Algae**. 2^a ed. San Francisco: Benjamin Cummings. 2009. 720 p.

GROMSKI, P.S. *et al.* A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis – a marriage of convenience or a shotgun wedding. **Anal. Chim. Acta**, v. 879, p. 10–23. 2015.
doi:10.1016/j.aca.2015.02.012

GUINDA, X. *et al.* Comparison of two methods for quality assessment of macroalgae assemblages, under different pollution types. **Ecol. Indic.**, v. 8, p. 743–753. 2008. doi: 10.1016/j.ecolind.2008.01.004

GURDENIZ, G. *et al.* Comparison of fatty acid profiles and mid-infrared spectral data for classification of olive oils. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, v. 112, p. 218-226. 2010. doi:10.1002/ejlt.200800229

HAGLUND, K. *et al.* New method for toxicity assessment in marine and brackish environments using the macroalga *Gracilaria tenuistipitata* (Gracilariales, Rhodophyta). **Hydrobiologia**, v. 326/327, p. 317-325. 1996.

HAMZA-CHAFFAI, A. Usefulness of bioindicators and biomarkers in pollution biomonitoring. **Int. J. Biotechnol. Wellness Ind.**, v. 3, P. 19-26. 2014. doi:10.6000/1927-3037.2014.03.01.4

HAN, Y. S. *et al.* Evaluating aquatic toxicity by visual inspection of thallus color in the green macroalga *Ulva*: Testing a novel bioassay. **Environ. Sci. Technol.**, v. 41, p. 3667-3671. 2007. doi:10.1021/es062158a

HAN, T., CHOI, G. W. A novel marine algal toxicity bioassay based on sporulation inhibition in the green macroalga *Ulva pertusa* (Chlorophyta). **Aquat. Toxicol.**, v. 75, p. 202-212. 2005. doi:10.1016/j.aquatox.2005.08.003

HAN, T. *et al.* Physiological responses of *Ulva pertusa* and *U. armoricana* to copper exposure. **Aquat. Toxicol.**, v. 86, p. 176-184. 2008. doi:10.1016/j.aquatox.2007.10.016

HARITASH, A.K.; KAUSHIK, C.P. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. **J. Hazard. Mater.**, v. 169, p. 1–15. 2009. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.03.137

HARITONIDIS, S.; MALEA, P. Bioaccumulation of metals by the green alga *Ulva rigida* from Thermaikos Gulf, Greece. **Environ. Pollut.**, v. 104, p. 365-372. 1999. doi:10.1016/S0269-7491(98)00192-4

HAVAUX, M. Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. **Trends Plant Sci.**, v. 3, p. 147-151. 1998. doi:10.1016/S1360-1385(98)01200-X

HISCOX, J. D; ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Can. J. Bot.**, 57: 1332-1334, 1979.

HO, Y. B. *Ulva lactuca* as bioindicator of metal contamination in intertidal waters in Hong Kong. **Hydrobiologia**, v. 203, p. 73-81. 1990. doi:10.1007/BF00005615

HULSHOF, P.J.M. *et al.* Quick screening of maize kernels for provitamin A content. **J. Food Compos. Anal.** v. 20, p. 655–661. 2007. doi:10.1016/j.jfca.2006.04.014S

ISLAM, M. S.; TANAKA, M. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 48, p. 624-649. 2004. doi:10.1016/j.marpolbul.2003.12.004

JAIN, A.K. *et al.* Data clustering: a review. **ACM Comput. Surv.**, v. 31, p. 264–323. 1999. doi:10.1145/331499.331504

JAMERS, A. *et al.* Omics in algae: Paving the way for a systems biological understanding of algal stress phenomena? **Aquat. Toxicol.**, v. 92, p. 114-121. 2009. doi:10.1016/j.aquatox.2009.02.012

JOHNSON, H.E. *et al.* Metabolic fingerprinting of salt-stressed tomatoes. **Phytochemistry**, v. 62, p- 919–928. 2003. doi:10.1016/S0031-9422(02)00722-7

KACURÁKOVÁ, M. FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. **Carbohydr. Polym.**, v. 43, p. 195–203. 2000. doi:10.1016/S0144-8617(00)00151-X

KHODDAMI, A. *et al.* Techniques for analysis of plant phenolic compounds. **Molecules**, v. 18, p. 2328–2375. 2013. doi:10.3390/molecules18022328

KIM, S.W. *et al.* Taxonomic discrimination of flowering plants by multivariate analysis of Fourier transform infrared spectroscopy data. **Plant Cell Rep.**, v. 23, p. 246–250. 2004. doi:10.1007/s00299-004-0811-1

KLOAREG, B.; QUATRANO, S. Structure of the cell walls of marine algae: ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *In: Oceanography and Marine Biology, an Annual Review*. Barnes, H. & Barnes, M. (Eds). Aberddden Universtity Press, v. 26, p. 221-272. 1988.

KORTE, F. *et al.* Organic toxicants and plants. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 47, p. 1-26. 2000. doi:10.1006/eesa.2000.1929

KUMAR, M. *et al.* Differential responses to cadmium induced oxidative stress in marine macroalga *Ulva lactuca* (Ulvales, Chlorophyta). **BioMetals**, v. 23, p. 315-325. 2010. doi:10.1007/s10534-010-9290-8

KUMAR, M. *et al.* Metabolomics: An emerging frontier of systems biology in marine macrophytes. **Algal Res.**, v. 16, p. 76-92. 2016. doi:10.1016/j.algal.2016.02.033

KUREYSHEVICH, A. V.; GUSEYNOVA, V. P. Influence of Oil Products on the Growth and Content of Pigments in the Cultures of *Microcystis aeruginosa* Kütz. emend. Elenk. and *Desmodesmus armatus* (Chod.) Hegew. **Hydrobiol. J.**, v. 44, p. 70-80. 2008. doi:10.1615/HydrobJ.v44.i4.70

LABORATORIO DE BOTÁNICA MARINA - UNIVERSIDADE CATÓLICA DEL NORTE. **Capa diestromática Ulva sp.** Disponível em: <http://www.botanicamarina.cl/Imagenes_verdes_005.htm>. Acesso em: 29 de agosto de 2016.

LAHAYE, M. *et al.* Chemical composition and ^{13}C NMR spectroscopic characterisation of ulvans from *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta). **J. Appl. Phycol.**, v. 11, p. 1-7. 1999. doi:10.1023/A:1008063600071

LAHAYE, M.; ROBIC, A. Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 1765-1774. 2007. doi:10.1021/bm061185q

LEE, R. E. **Phycology**. 4ª edição. Cambridge University Press, 547 p., 2008.

LEE, W.; WANG, W.-X. Metal accumulation in the green macroalga *Ulva fasciata*: effects of nitrate, ammonium and phosphate. **Sci. Total Environ.**, v. 278, p. 11-22. 2001. doi:10.1016/S0048-9697(00)00884-6

LELIAERT, F. *et al.* Phylogeny and molecular evolution of the green algae. **Crit. Rev. Plant Sci.**, v. 31, p. 1-46. 2012. doi:10.1080/07352689.2011.615705

LESTON, S. *et al.* The effects of chloramphenicol on *Ulva lactuca*. **Chemosphere**, v. 91, p. 552-557. 2013. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.12.061

LEWIS, M.; PRYOR, R. Toxicities of oils, dispersants and dispersed oils to algae and aquatic plants: Review and database value to resource sustainability. **Environ. Pollut.**, v. 180, p. 345-367. 2013. doi:10.1016/j.envpol.2013.05.001

LOBBAN, C. S.; WYNNE, M. J. **The biology of seaweeds**. University of California Press. 1981. 786 p.

MALEA, P.; HARITONIDIS, S. Use of the green alga *Ulva rigida* C. Agardh as an indicator species to reassess metal pollution in the Thermaikos Gulf, Greece, after 13 years. **J. Appl. Phycol.**, v. 12, p. 169-176. 2000. doi:10.1023/A:1008136320459

MARTINS, C. D. L. *et al.* The impact of coastal urbanization on the structure of phytobenthic communities in southern Brazil. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 64, p. 772-778, 2012. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.01.031

MCCULLY, M.E. The histological localization of the structural polysaccharides of seaweeds. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 175, p. 702-711. 1970.

MENDIBURU, F. **Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. R Packag. version 1.2-1**. 2014.

MONTONE, R. C. *et al.* Determination of polychlorinated biphenyls in Antarctic macroalgae *Desmarestia* sp. **Sci. Total. Environ.**, v. 277, p. 181-186. 2001. doi:10.1016/S0048-9697(00)00876-7

NAUMANN, A. *et al.* Efficient discrimination of oat and pea roots by cluster analysis of Fourier transform infrared (FTIR) spectra. **F. Crop. Res.** 119, 78–84. 2010. doi:10.1016/j.fcr.2010.06.017

NAUMANN, A. *et al.* Fourier transform infrared microscopy and imaging: Detection of fungi in wood. **Fungal Genet. Biol.**, v. 42, p. 829–835. 2005. doi:10.1016/j.fgb.2005.06.003

NECHEV, J. T. *et al.* Effect of diesel fuel pollution on the lipid composition of some wide-spread Black Sea algae and invertebrates. **Z. Naturforsch C.**, v. 57, p. 339-343. 2002.

NUNES *et al.* PCDD/Fs and dioxin-like PCBs in sediment and biota from the Mondego estuary (Portugal). **Chemosphere**, v. 83, p. 1345–1352. 2011. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.02.081

O'BRIEN, P. Y.; DIXON, P. S. The effects of oils and oil components on algae: a review. **Brit. Phycol. J.**, v. 11, p. 125, 142. 1976. doi:10.1080/00071617600650161

PAVIA, D. L. *et al.* **Introduction to spectroscopy**. 4th ed. Belmont: Brooks/ Cole. 2009. 716p.

PAVONI, B. *et al.* Organic micropollutants (PAHs, PCBs, pesticides) in seaweeds of the lagoon of Venice. **Oceanol. Acta**, v. 26, p. 585-596. 2003. doi:10.1016/S0399-1784(03)00052-5

PEDRINI, A. G. *at al.* Parte I - Características Gerais. Macroalgas (Chlorophyta) e gramas (Magnoliophyta) marinhas do Brasil. In: **Macroalgas (Chlorophyta) e gramas (Magnoliophyta) marinhas do Brasil**. PEDRINI, A. G. (Org.). Rio de Janeiro: Technical Books Editora. 144p. 2011.

PEREIRA, P. *et al.* Metal accumulation and oxidative stress in *Ulva* sp. substantiated by response integration into a general stress index. **Aquat. Toxicol.**, v. 91, p. 336-345. 2009. doi:10.1016/j.aquatox.2008.12.003

PEREIRA, S. M. B. *et al.* Capítulo 3 - Taxonomia de clorófitas marinhas. In: **Macroalgas (Chlorophyta) e gramas (Magnoliophyta) marinhas do Brasil**. PEDRINI, A. G. (Org.). Rio de Janeiro: Technical Books Editora. 144p. 2011.

PÉREZ-MAYORGA, D. M. *et al.* Nitrogen uptake and growth by the opportunistic macroalga *Ulva lactuca* (Linnaeus) during the internal tide. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 406, p. 108-115. 2011. doi:10.1016/j.jembe.2011.05.028

PHILLIPS, D. J. H. Use of biological indicator organisms to quantitate organochlorine pollutants in aquatic environments - A Review. **Environ. Pollut.**, v. 16, p. 167-229. 1978. doi:10.1016/0013-9327(78)90117-9

PISTORIUS, A.M.A. *et al.* Monitoring of biomass composition from microbiological sources by means of FT-IR spectroscopy. **Biotechnol. Bioeng.** v. 103, p. 123–129. 2009. doi:10.1002/bit.22220

RAINBOW, P. Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 31, p. 183-192. 1995. doi:10.1016/0025-326X(95)00116-5

RAMLOV, F. *et al.* Metabolic and cellular alterations induced by diesel oil in *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta). **J. Appl. Phycol.**, v. 26, p. 1879-1888. 2013. doi: 10.1007/s10811-013-0209-y

STEELE, R.; THURSBY, G. B. A toxicity test using life stages of *Champia parvula* (Rhodophyta). In: BISHOP, W. E.; CARDWELL, R. D.; HEIDOLPH, B. B. (Eds.). **Proceedings of the Sixth Symposium on Aquatic Toxicology and Hazard Assessment. American Society for Testing and Materials**, Baltimore, p. 73-89. 1983.

WICHARD, T. *et al.* The green seaweed *Ulva*: a model system to study morphogenesis. **Front. Plant Sci.**, v. 6, artigo digital nº 72. 2015. doi:10.3389/fpls.2015.00072

RAO, D. *et al.* Microbial colonization and competition on the marine alga *Ulva australis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, 72, 5547-5555. 2006. doi:10.1128/AEM.00449-06

ROBIC, A. *et al.* Determination of the chemical composition of ulvan, a cell wall polysaccharide from *Ulva* spp. (Ulvales, Chlorophyta) by FT-IR and chemometrics. **J. Appl. Phycol.**, v. 21, p. 451-456. 2009. doi:10.1007/s10811-008-9390-9

RODRIGUES, R. V. *et al.* Deleterious effects of water-soluble fraction of petroleum, diesel and gasoline on marine pejerrey *Odontesthes argentinensis* larvae. **Sci. Total. Environ.**, v. 408, p. 2054-2059. 2010. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.01.063

RODRIGUES, E. R. O. **Respostas bioquímicas e na organização celular da alga parda *Sargassum cymosum* var. *stenohyllum* (Martius) Grunow (Heterokontophyta, Fucales) à exposição à gasolina e ao óleo diesel.** 2014. 134 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, Florianópolis, 2014. Disponível em: <<http://www.bu.ufsc.br/teses/PBVE0147-D.pdf>>

ROHAETI, E. *et al.* Fourier transform infrared spectroscopy combined with chemometrics for discrimination of *Curcuma longa*, *Curcuma xanthorrhiza* and *Zingiber cassumunar*. **Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.**, v. 137, p. 1244-1249. 2015. doi:10.1016/j.saa.2014.08.139

SANTOS, R. W. *et al.* Bioabsorption of cadmium, copper and lead by the red macroalga *Gelidium floridanum*: Physiological responses and ultrastructure features. **Ecotox. Environ. Safe.**, v. 105, p. 80-89. 2014. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.02.021

SCHERNER *et al.* Photosynthetic response of two seaweed species along an urban pollution gradient: Evidence of selection of pollution-tolerant species. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 64, p. 2380-2390. 2012. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.08.012

SCHIAVON, M. *et al.* Accumulation of selenium in *Ulva* sp. and effects on morphology, ultrastructure and antioxidant enzymes and metabolites. **Aquat. Toxicol.** v. 122-123, p. 222-231. 2012. doi:10.1016/j.aquatox.2012.06.014

SCHMIDT, E. C. *et al.* Changes in ultrastructure and histochemistry of two red macroalgae strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales), as a consequence of ultraviolet B radiation exposure. **Micron**, v. 40, p. 860-869. 2009. doi:10.1016/j.micron.2009.06.003

SCHMIDT, E. C. *et al.* Effects of UVB radiation on the agarophyte *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta, Gracilariiales): Changes in cell organization, growth and photosynthetic performance. **Micron**, v. 41, p. 919-930. 2010. doi:10.1016/j.micron.2010.07.010

SCHMIDT, E. C. *et al.* Responses of the macroalgae *Hypnea musciformis* after in vitro exposure to UV-B. **Aquatic. Bot.**, v. 100, p. 8-17. 2012. doi:10.1016/j.aquabot.2012.03.004

SCHWEIKERT, K.; BURRITT, D. J. The organophosphate insecticide Coumaphos induces oxidative stress and increases antioxidant and detoxification defences in the green macroalgae *Ulva pertusa*. **Aquat. Toxicol.**, v. 122-123, p. 86-92, 2012. doi:10.1016/j.aquatox.2012.05.003

SCOTT, C.E., ELDRIDGE, A.L. Comparison of carotenoid content in fresh, frozen and canned corn. **J. Food Compos. Anal.**, v. 18, p. 551–559. 2005. doi:10.1016/j.jfca.2004.04.001

SÉNÉ, C. F. B. *et al.* Fourier-Transform Raman and Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (An Investigation of Five Higher Plant Cell

Walls and Their Components). **Plant Physiology**, v. 106, p. 1623-1631. 1994. doi: 10.1104/pp.106.4.1623

SIMONATO, J.D. *et al.* Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 69, p. 112-120. 2008. doi:10.1016/j.ecoenv.2007.01.012

STEFFENSEN, D. A. The effect of nutrient enrichment and temperature on the growth in culture of *Ulva lactuca* L. **Aquat. Bot.**, v. 2, p. 337-351. 1976.

STEPHENS, S. M. *et al.* Stress responses of larval turbot, *Scophthalmus maximus* L., exposed to sub-lethal concentrations of petroleum hydrocarbons. **Fish Physiol. Biochem.**, v. 17, p. 433-439. 1997. doi:10.1023/A:1007799928020

SUMICH, J. L.; MORRISSEY, J. F. **Introduction to the Biology of Marine Life**. 10th ed. Jones and Barlett Publishers. 2012. 472 p.

SZALONTAI, B. *et al.* Molecular rearrangements of thylakoids after heavy metal poisoning, as seen by Fourier transform infrared (FTIR) and electron spin resonance (ESR) spectroscopy. **Photosynth. Res.**, v. 61, p. 241-252. 1999. doi:10.1023/A:1006345523919

SZYMANSKA-CHARGOT, M. *et al.* Combining FT-IR spectroscopy and multivariate analysis for qualitative and quantitative analysis of the cell wall composition changes during apples development. **Carbohydr. Polym.**, v. 115, p. 93-103. 2015. doi:10.1016/j.carbpol.2014.08.039

THE SEAWEED SITE: INFORMATION ON MARINE ALGAE. *Ulva lactuca* Linnaeus. Disponível em: <http://www.seaweed.ie/descriptions/Ulva_lactuca.php>. Acesso em: 01 de março de 2014.

TIBURTIUS, E. R. L.; PERALTA-ZAMORA, P. Contaminação de águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. **Quim. Nova**, v. 27, p. 441-446. 2004. doi:10.1590/S0100-40422004000300014

- TORRES, M. A. *et al.* Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review. **Ecotox. Environ. Safe.**, v. 71, p. 1-15. 2008. doi:10.1016/j.ecoenv.2008.05.009
- TURNER, A.; FURNISS, O. An evaluation of the toxicity and bioaccumulation of thallium in the coastal marine environment using the macroalga, *Ulva lactuca*. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 64, p. 2720-2724. 2012. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.09.023
- UARROTA, V.G. *et al.* Metabolomics combined with chemometric tools (PCA, HCA, PLS-DA and SVM) for screening cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots during postharvest physiological deterioration. **Food Chem.**, v. 161, p. 67-78. 2014. doi:10.1016/j.foodchem.2014.03.110
- UMBREIT, W. W.; BURRIS, R. H. **Method for glucose determination and other sugars. Manometric techniques.** 1^a ed. Burgess Publishing Co. 1964.
- ÜNAL, D. *et al.* Effects of Chromium VI stress on green alga *Ulva lactuca* (L.). **Turk. J. Biol.**, v. 34, p. 119-124. 2010. doi:10.3906/biy-0810-3
- VIEIRA, P. A. *et al.* Biodegradation of diesel oil and gasoline contaminated effluent employing intermittent aeration. **J. Hazard Mater.**, v. 168, p. 1366-1372. 2009. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.03.023
- VIEIRA, P. A. *et al.* Biodegradation of effluent contaminated with diesel fuel and gasoline. **J. Hazard Mater.**, v. 140, p. 52-59. 2007. doi:10.1016/j.jhazmat.2006.06.048
- WAGNER, H. *et al.* Surveillance of C-Allocation in Microalgal Cells. **Metabolites**, v. 4, p. 453-464. 2014. doi:10.3390/metabo4020453
- WAGNER, H. *et al.* The use of FTIR spectroscopy to assess quantitative changes in the biochemical composition of microalgae. **J. Biophotonics**, v. 3, p- 557-566. 2010. doi:10.1002/jbio.201000019
- WEST, K. R.; PITMAN, M. G. Ionic relations and ultrastructure in *Ulva lactuca*. **Aust. J. Biol. Sci.**, 20: 901-14, 1967.

WICKHAM, H. **Ggplot2: elegant graphics for data analysis**. Springer New York. 2009.

WICKHAM, H.; CHANG, W. **Devtools: Tools to Make Developing R Packages Easier**. 2015.

WILSON, R. H. *et al.* The mechanical properties and molecular dynamics of plant cell wall polysaccharides studied by Fourier-transform infrared spectroscopy. **Plant Physiology**, v. 124, p. 397–406. 2000.

YAN, S.; ZHOU, Q. Toxic effects of *Hydrilla verticillata* exposed to toluene, ethylbenzene and xylene and safety assessment for protecting aquatic macrophytes. **Chemosphere**, v. 85, p. 1088–1094. 2011. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.07.040

YANG, J.; YEN, H. Early salt stress effects on the changes in chemical composition in leaves of ice plant and Arabidopsis. A Fourier transform infrared spectroscopy study. **Plant Physiol.**, v.130, p. 1032–1042. 2002. doi:10.1104/pp.004325.ice

ZANETTE, J. *et al.* Salinity influences glutathione S-transferase activity and lipid peroxidation responses in the *Crassostrea gigas* oyster exposed to diesel oil. **Sci. Total. Environ.**, v. 409, p. 1976–1983. 2011. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.01.048

APÊNDICE A

Conteúdos de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofilas totais, polifenóis, açúcares solúveis e amido de talos de *U. lactuca* não exposta (controle) e exposta à gasolina (0.001-1%, v/v) por 30 min, 1 h, 12 h, e 24 h. Os valores mostrados são médias \pm desvio padrão (DP) ($n \geq 2$). Letras distintas ao lado do DP indicam diferença significativa (teste de Tukey, $p \leq 0,05$) entre os grupos.

Grupos	Tempo de Exposição	Concentração (%)	Clorofila a (mg.g ⁻¹ MS)	Clorofila b (mg.g ⁻¹ MS)
Controle	0	0	5,733 \pm 0,039 ^g	2,743 \pm 0,021 ^g
GT1C1	30 min	0,001	4,789 \pm 0,028 ⁱ	2,319 \pm 0,004 ^j
GT1C2	30 min	0,01	8,190 \pm 0,091 ^b	4,360 \pm 0,042 ^a
GT1C3	30 min	0,1	7,060 \pm 0,032 ^d	3,612 \pm 0,003 ^c
GT1C4	30 min	1	5,643 \pm 0,016 ^g	2,745 \pm 0,009 ^g
GT2C1	1 h	0,001	6,727 \pm 0,020 ^e	3,563 \pm 0,015 ^{cd}
GT2C2	1 h	0,01	6,724 \pm 0,058 ^e	3,508 \pm 0,010 ^{de}
GT2C3	1 h	0,1	4,310 \pm 0,022 ^j	2,182 \pm 0,016 ^k
GT2C4	1 h	1	7,649 \pm 0,025 ^c	3,875 \pm 0,030 ^b
GT3C1	12 h	0,001	5,884 \pm 0,019 ^f	2,943 \pm 0,032 ^f
GT3C2	12 h	0,01	4,992 \pm 0,033 ^h	2,443 \pm 0,031 ^{hi}
GT3C3	12 h	0,1	8,491 \pm 0,097 ^a	4,340 \pm 0,013 ^a
GT3C4	12 h	1	3,728 \pm 0,021 ^k	1,964 \pm 0,006 ^l
GT4C1	24 h	0,001	4,719 \pm 0,026 ⁱ	2,413 \pm 0,003 ⁱ
GT4C2	24 h	0,01	7,117 \pm 0,028 ^d	3,459 \pm 0,017 ^e
GT4C3	24 h	0,1	4,303 \pm 0,021 ^j	2,149 \pm 0,013 ^k
GT4C4	24 h	1	4,809 \pm 0,014 ⁱ	2,504 \pm 0,028 ^h

Apêndice A (Continuação)

Grupos	Clorofilas Totais (mg.g⁻¹ MS)	Carotenoides Totais (µg.g⁻¹ MS)	Polifenóis (µg.g⁻¹ MS)
Controle	8,476 ± 0,059 ^g	817,233 ± 124,388 ^{cde}	753,326 ± 33,035 ^c
GT1C1	7,108 ± 0,029 ⁱ	1112,205 ± 161,904 ^b	544,269 ± 34,760 ^{efgh}
GT1C2	12,55 ± 0,130 ^b	764,953 ± 58,668 ^{cdef}	1016,450 ± 70,908 ^b
GT1C3	10,672 ± 0,031 ^d	899,614 ± 81,350 ^{bcd}	1524,674 ± 57,219 ^a
GT1C4	8,388 ± 0,008 ^g	1548,534 ± 140,765 ^a	728,095 ± 24,973 ^{cd}
GT2C1	10,290 ± 0,010 ^e	747,818 ± 42,218 ^{cdef}	621,764 ± 38,231 ^{cde}
GT2C2	10,232 ± 0,061 ^e	908,328 ± 51,769 ^{bc}	616,358 ± 38,988 ^{de}
GT2C3	6,492 ± 0,021 ^j	619,459 ± 28,035 ^{efghi}	475,785 ± 10,813 ^{fghi}
GT2C4	11,524 ± 0,011 ^c	537,827 ± 33,057 ^{fghi}	717,282 ± 70,355 ^{cd}
GT3C1	8,827 ± 0,049 ^f	719,002 ± 7,809 ^{cdefg}	601,940 ± 24,972 ^{def}
GT3C2	7,434 ± 0,017 ^h	690,101 ± 77,941 ^{cdefgh}	565,896 ± 12,486 ^{efg}
GT3C3	12,831 ± 0,110 ^a	678,632 ± 67,011 ^{defgh}	421,719 ± 67,529 ^{hi}
GT3C4	5,692 ± 0,020 ^k	482,063 ± 41,023 ^{hij}	360,443 ± 16,518 ⁱ
GT4C1	7,132 ± 0,022 ⁱ	496,764 ± 59,029 ^{ghij}	450,554 ± 34,760 ^{ghi}
GT4C2	10,576 ± 0,030 ^d	550,896 ± 23,358 ^{fghi}	482,994 ± 37,975 ^{efghi}
GT4C3	6,452 ± 0,034 ^j	298,598 ± 19,565 ^j	385,674 ± 43,702 ⁱ
GT4C4	7,313 ± 0,036 ^h	414,526 ± 23,504 ^{ij}	555,082 ± 6,243 ^{efg}

Apêndice A (Continuação)

Grupos	Açúcares Solúveis (mg.g⁻¹ MS)	Amido (mg.g⁻¹ MS)
Controle	43,720 ± 11,623 ^c	494,916 ± 13,382 ^{ef}
GT1C1	25,183 ± 3,244 ^{defg}	468,114 ± 9,994 ^{ef}
GT1C2	23,413 ± 1,449 ^{efg}	671,739 ± 30,706 ^{de}
GT1C3	20,517 ± 3,564 ^{fg}	650,706 ± 162,132 ^{def}
GT1C4	15,230 ± 2,187 ^g	565,645 ± 42,294 ^{ef}
GT2C1	24,293 ± 3,755 ^{defg}	480,026 ± 47,559 ^{ef}
GT2C2	39,103 ± 4,198 ^{cde}	513,529 ± 34,395 ^{ef}
GT2C3	17,937 ± 1,077 ^g	551,313 ± 51,117 ^{ef}
GT2C4	36,207 ± 2,793 ^{cdef}	293,897 ± 13,795 ^f
GT3C1	16,848 ± 3,233 ^g	1052,781 ± 30,798 ^{cd}
GT3C2	23,038 ± 5,273 ^{efg}	1021,698 ± 190,367 ^{cd}
GT3C3	49,253 ± 6,968 ^{bc}	942,035 ± 141,566 ^{cd}
GT3C4	40,320 ± 4,859 ^{cd}	1079,025 ± 99,200 ^c
GT4C1	48,064 ± 5,547 ^{bc}	1452,176 ± 230,428 ^b
GT4C2	68,410 ± 2,699 ^a	2052,813 ± 215,623 ^a
GT4C3	59,960 ± 5,586 ^{ab}	2002,000 ± 194,200 ^a
GT4C4	62,443 ± 8,650 ^{ab}	2230,753 ± 75,926 ^a

APÊNDICE B

Perfil carotenóidico de *U. lactuca* não exposta (controle) e exposta à gasolina (0.001-1%, v/v) por 30 min, 1 h, 12 h, e 24 h. Valores são médias \pm desvio padrão (DP) ($n \geq 2$). Letras distintas ao lado do DP indicam diferença significativa (teste de Tukey, $p \leq 0.05$) entre os grupos. ND = não detectado.

Grupos	Tempo de exposição	Concentração (%)	Composto não-identificado ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS)
Controle	0	0	$10,48 \pm 2,75$ ^{bcd}
GT1C1	30 min	0,001	$6,057 \pm 1,17$ ^{cd}
GT1C2	30 min	0,01	$9,679 \pm 0,53$ ^{bcd}
GT1C3	30 min	0,1	$20,292 \pm 2,91$ ^{ab}
GT1C4	30 min	1	$10,648 \pm 0,81$ ^{bcd}
GT2C1	1 h	0,001	$13,896 \pm 9,98$ ^{bcd}
GT2C2	1 h	0,01	$20,012 \pm 2,31$ ^{ab}
GT2C3	1 h	0,1	$28,182 \pm 1,78$ ^a
GT2C4	1 h	1	$13,204 \pm 5,88$ ^{bcd}
GT3C1	12 h	0,001	$12,703 \pm 2,78$ ^{bcd}
GT3C2	12 h	0,01	$15,625 \pm 2,74$ ^{bc}
GT3C3	12 h	0,1	$11,936 \pm 3,30$ ^{bcd}
GT3C4	12 h	1	$9,7 \pm 2,31$ ^{bcd}
GT4C1	24 h	0,001	$3,934 \pm 1,43$ ^d
GT4C2	24 h	0,01	ND
GT4C3	24 h	0,1	ND
GT4C4	24 h	1	$19,418 \pm 0,75$ ^{ab}

Apêndice B (Continuação)

Grupos	Luteína (µg.g-1 MS)	Zeaxantina (µg.g-1 MS)	β-Criptoxantina (µg.g-1 MS)
Controle	132,23 ± 31,33 ^{ab}	55,122 ± 8,78 ^a	14,154 ± 2,40 ^{abc}
GT1C1	112,582 ± 10,87 ^{abc}	28,047 ± 2,45 ^{bc}	16,102 ± 1,07 ^a
GT1C2	161,877 ± 56,98 ^a	42,852 ± 12,88 ^a	8,016 ± 0,58 ^{fgh}
GT1C3	95,189 ± 5,77 ^{bcd}	28,891 ± 2,13 ^b	12,749 ± 1,39 ^{bcd}
GT1C4	169,881 ± 12,28 ^a	3,675 ± 0,89 ^e	15,541 ± 1,73 ^{ab}
GT2C1	90,063 ± 33,55 ^{bcd}	ND	8,358 ± 0,73 ^{efgh}
GT2C2	170,413 ± 14,34 ^a	ND	10,549 ± 0,46 ^{defg}
GT2C3	167,817 ± 7,32 ^a	ND	6,954 ± 0,40 ^h
GT2C4	58,89 ± 8,88 ^{cde}	18,615 ± 2,40 ^{bcd}	8,451 ± 0,64 ^{efgh}
GT3C1	81,77 ± 8,02 ^{bcde}	28,296 ± 1,27 ^b	10,581 ± 0,62 ^{defg}
GT3C2	58,268 ± 9,35 ^{cde}	18,382 ± 0,84 ^{bcd}	10,774 ± 1,07 ^{def}
GT3C3	50,349 ± 7,74 ^{de}	16,466 ± 0,61 ^{cd}	11,327 ± 0,87 ^{cde}
GT3C4	51,391 ± 4,94 ^{de}	20,593 ± 2,28 ^{bc}	8,178 ± 0,46 ^{fgh}
GT4C1	63,241 ± 21,13 ^{cde}	15,034 ± 2,11 ^{cde}	7,315 ± 0,56 ^h
GT4C2	97,516 ± 8,31 ^{bcd}	25,108 ± 1,03 ^{bc}	8,926 ± 0,09 ^{efgh}
GT4C3	28,752 ± 3,42 ^e	8,400 ± 2,28 ^{de}	3,872 ± 0,40 ⁱ
GT4C4	51,072 ± 1,53 ^{de}	17,774 ± 2,20 ^{bcd}	7,704 ± 0,32 ^{gh}

Apêndice B (Continuação)

Grupos	α-Caroteno ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS)	trans-β-Caroteno ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS)	cis-β-Caroteno ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS)
Controle	57,528 \pm 9,09 ^{defg}	383,859 \pm 55,48 ^{cd}	163,86 \pm 27,24 ^{defg}
GT1C1	120,436 \pm 18,51 ^a	548,43 \pm 81,29 ^b	280,551 \pm 48,22 ^b
GT1C2	83,811 \pm 3,41 ^{bc}	298,111 \pm 13,22 ^{defgh}	174,891 \pm 13,08 ^{def}
GT1C3	91,244 \pm 8,23 ^b	405,979 \pm 38,61 ^{cd}	245,27 \pm 23,52 ^{bc}
GT1C4	121,746 \pm 11,81 ^a	831,918 \pm 77,66 ^a	395,125 \pm 38,04 ^a
GT2C1	70,952 \pm 17,78 ^{bcde}	359,927 \pm 19,52 ^{cde}	204,623 \pm 21,11 ^{cd}
GT2C2	67,141 \pm 2,63 ^{bcdef}	416,647 \pm 18,93 ^c	223,567 \pm 13,44 ^{bcd}
GT2C3	57,09 \pm 1,06 ^{defg}	234,121 \pm 12,77 ^{fghi}	125,295 \pm 7,51 ^{efgh}
GT2C4	65,296 \pm 2,40 ^{cdef}	263,706 \pm 8,18 ^{efghi}	109,666 \pm 8,60 ^{ghi}
GT3C1	72,661 \pm 3,09 ^{bcde}	337,706 \pm 6,77 ^{cdefg}	175,285 \pm 8,79 ^{def}
GT3C2	81,909 \pm 6,93 ^{bcd}	326,893 \pm 37,67 ^{cdefg}	178,251 \pm 20,12 ^{de}
GT3C3	63,744 \pm 6,37 ^{cdefg}	342,866 \pm 31,94 ^{cdef}	181,944 \pm 19,40 ^{cde}
GT3C4	43,865 \pm 3,78 ^{fg}	229,683 \pm 19,03 ^{ghi}	118,654 \pm 13,64 ^{efghi}
GT4C1	51,872 \pm 8,88 ^{efg}	247,527 \pm 36,10 ^{fghi}	112,852 \pm 20,42 ^{fghi}
GT4C2	71,634 \pm 3,83 ^{bcde}	240,573 \pm 8,26 ^{fghi}	107,139 \pm 4,20 ^{ghi}
GT4C3	39,601 \pm 2,74 ^g	162,526 \pm 11,05 ⁱ	55,447 \pm 2,79 ⁱ
GT4C4	57,777 \pm 3,58 ^{defg}	190,432 \pm 14,62 ^{hi}	70,349 \pm 3,81 ^{hi}

APÊNDICE C

Conteúdos de clorofilas *a*, *b*, clorofilas totais, polifenóis, açúcares solúveis e amido de talos de *U. lactuca* não exposta (controle) e exposta ao óleo diesel (0.001-1%, v/v) por 30 min, 1 h, 12 h, e 24 h. Os valores são mostrados como médias \pm desvio padrão (DP) ($n \geq 2$). Letras distintas ao lado do DP indicam diferença significativa (teste de Tukey, $p \leq 0.05$) entre os grupos.

Grupos	Tempo de exposição	Concentração (%)	Clorofila <i>a</i> (mg.g ⁻¹ MS)	Clorofila <i>b</i> (mg.g ⁻¹ MS)
Controle	0	0	5,733 \pm 0,039 ⁱ	2,743 \pm 0,021 ^h
DT1C1	0,5	0,001	7,788 \pm 0,027 ^e	3,845 \pm 0,046 ^f
DT1C2	0,5	0,01	9,198 \pm 0,019 ^c	4,706 \pm 0,027 ^c
DT1C3	0,5	0,1	8,433 \pm 0,012 ^d	4,207 \pm 0,036 ^e
DT1C4	0,5	1	10,011 \pm 0,069 ^b	5,272 \pm 0,040 ^b
DT2C1	1	0,001	6,874 \pm 0,032 ^f	3,867 \pm 0,004 ^f
DT2C2	1	0,01	8,525 \pm 0,064 ^d	4,489 \pm 0,031 ^d
DT2C3	1	0,1	4,692 \pm 0,016 ^k	2,345 \pm 0,022 ^j
DT2C4	1	1	9,103 \pm 0,024 ^c	4,566 \pm 0,002 ^d
DT3C1	12	0,001	6,646 \pm 0,036 ^g	3,254 \pm 0,028 ^g
DT3C2	12	0,01	5,163 \pm 0,017 ^j	2,523 \pm 0,015 ⁱ
DT3C3	12	0,1	6,385 \pm 0,059 ^h	3,285 \pm 0,027 ^g
DT3C4	12	1	3,813 \pm 0,035 ^l	1,921 \pm 0,077 ^k
DT4C1	24	0,001	8,449 \pm 0,043 ^d	4,278 \pm 0,018 ^e
DT4C2	24	0,01	10,848 \pm 0,088 ^a	5,652 \pm 0,026 ^a
DT4C3	24	0,1	3,886 \pm 0,022 ^l	1,96 \pm 0,021 ^k
DT4C4	24	1	3,633 \pm 0,036 ^m	1,653 \pm 0,015 ^l

Apêndice C (Continuação)

Grupos	Clorofilas Torais (mg.g⁻¹ MS)	Carotenoides Totais (µg.g⁻¹ MS)	Polifenóis (µg.g⁻¹ MS)
Controle	8,476 ± 0,059 ^k	817,233 ± 124,388 ^{cde}	753,326 ± 33,035 ^{ab}
DT1C1	11,633 ± 0,066 ^g	1300,829 ± 128,809 ^a	717,282 ± 16,518 ^b
DT1C2	13,905 ± 0,043 ^c	816,341 ± 19,486 ^{cde}	306,377 ± 12,486 ^{fg}
DT1C3	12,64 ± 0,040 ^f	648,164 ± 81,063 ^{ef}	309,981 ± 6,243 ^{fg}
DT1C4	15,283 ± 0,096 ^b	590,291 ± 54,036 ^{ef}	508,225 ± 28,609 ^c
DT2C1	10,74 ± 0,036 ^h	821,286 ± 32,359 ^{cde}	457,763 ± 12,486 ^{cd}
DT2C2	13,013 ± 0,034 ^c	614,878 ± 23,976 ^{ef}	504,621 ± 33,035 ^c
DT2C3	7,038 ± 0,029 ^m	739,364 ± 114,993 ^{cdef}	479,39 ± 16,518 ^{cd}
DT2C4	13,669 ± 0,023 ^d	920,828 ± 27,498 ^{bcd}	414,51 ± 16,518 ^{de}
DT3C1	9,9 ± 0,008 ⁱ	269,019 ± 59,047 ^g	360,443 ± 33,035 ^{fg}
DT3C2	7,686 ± 0,014 ^l	699,734 ± 54,955 ^{def}	317,19 ± 12,486 ^{fg}
DT3C3	9,67 ± 0,037 ^j	1118,174 ± 107,077 ^{ab}	281,146 ± 47,134 ^{fg}
DT3C4	5,734 ± 0,111 ⁿ	715,901 ± 96,017 ^{cdef}	439,74 ± 40,939 ^{cde}
DT4C1	12,727 ± 0,037 ^f	957,667 ± 63,074 ^{bc}	816,404 ± 38,231 ^a
DT4C2	16,5 ± 0,108 ^a	549,061 ± 88,112 ^f	490,202 ± 37,975 ^{cd}
DT4C3	5,846 ± 0,043 ⁿ	703,151 ± 91,727 ^{def}	264,925 ± 7,646 ^g
DT4C4	5,286 ± 0,052 ^o	751,877 ± 100,595 ^{cdef}	427,125 ± 7,647 ^{cde}

Apêndice C (Continuação)

Grupos	Açúcares Solúveis (mg.g⁻¹ MS)	Amido (mg.g⁻¹ MS)
Controle	43,72 ± 11,623 ^{cde}	494,916 ± 13,382 ⁱ
DT1C1	39,693 ± 0,075 ^{cdef}	783,602 ± 14,575 ^h
DT1C2	31,392 ± 0,622 ^{def}	793,839 ± 61,118 ^{gh}
DT1C3	33,391 ± 2,001 ^{def}	768,525 ± 39,898 ^h
DT1C4	31,011 ± 4,256 ^{ef}	1187,129 ± 17,418 ^e
DT2C1	41,809 ± 2,327 ^{cdef}	1000,628 ± 60,034 ^{efgh}
DT2C2	28,666 ± 0,246 ^f	765,361 ± 25,011 ^h
DT2C3	32,887 ± 0,952 ^{def}	1106,349 ± 45,673 ^{ef}
DT2C4	28,338 ± 2,998 ^f	963,588 ± 93,463 ^{efgh}
DT3C1	55,82 ± 8,097 ^{bc}	2366,999 ± 72,651 ^{ab}
DT3C2	67,427 ± 2,239 ^{ab}	2083,153 ± 154,497 ^{bc}
DT3C3	51,329 ± 3,82 ^{bc}	1969,428 ± 63,066 ^c
DT3C4	72,861 ± 5,397 ^a	2510,132 ± 27,966 ^a
DT4C1	45,01 ± 6,225 ^{cde}	1538,298 ± 20,137 ^d
DT4C2	46,147 ± 3,333 ^{cde}	888,913 ± 90,995 ^{fgh}
DT4C3	36,018 ± 0,685 ^{def}	1042,284 ± 200,031 ^{efg}
DT4C4	48,046 ± 2,686 ^{cd}	971,555 ± 104,154 ^{efgh}

APÊNDICE D

Perfil carotenóidico de *U. lactuca* não exposta (controle) e exposta ao óleo diesel (0.001-1%, v/v) por 30 min, 1 h, 12 h, e 24 h. Valores são médias \pm desvio padrão (DP) ($n \geq 2$). Letras distintas ao lado do DP indicam diferença significativa (teste de Tukey, $p \leq 0.05$) entre os grupos. ND = não detectado.

Grupos	Tempo de exposição	Concentração (%)	Composto não-identificado ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW)
Controle	0	0	$10,48 \pm 2,747$ ^{cde}
DT1C1	30 min	0,001	$16,815 \pm 2,995$ ^{bde}
DT1C2	30 min	0,01	$6,202 \pm 3,091$ ^{de}
DT1C3	30 min	0,1	$21,977 \pm 2,699$ ^{abc}
DT1C4	30 min	1	$14,194 \pm 3,012$ ^{bde}
DT2C1	1 h	0,001	$8,051 \pm 0,312$ ^{de}
DT2C2	1 h	0,01	$16,177 \pm 0,986$ ^{bde}
DT2C3	1 h	0,1	$15,783 \pm 9,869$ ^{bde}
DT2C4	1 h	1	$16,737 \pm 1,739$ ^{bcd}
DT3C1	12 h	0,001	ND
DT3C2	12 h	0,01	$10,1 \pm 0,808$ ^{cde}
DT3C3	12 h	0,1	$31,797 \pm 4,026$ ^a
DT3C4	12 h	1	$12,289 \pm 4,019$ ^{bde}
DT4C1	24 h	0,001	$32,93 \pm 4,42$ ^a
DT4C2	24 h	0,01	$3,429 \pm 1,018$ ^e
DT4C3	24 h	0,1	$24,845 \pm 8,842$ ^{ab}
DT4C4	24 h	1	$11,439 \pm 4,081$ ^{cde}

Apêndice D (Continuação)

Grupos	Luteína ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW)	Zeaxantina ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW)	β-Criptoxantina ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW)
Controle	132,23 \pm 31,328 ^{cde}	55,122 \pm 8,778 ^b	14,154 \pm 2,394 ^{bcd}
DT1C1	267,045 \pm 40,563 ^a	104,644 \pm 18,352 ^a	19,044 \pm 1,626 ^{ab}
DT1C2	59,589 \pm 6,716 ^e	17,087 \pm 2,908 ^{de}	14,47 \pm 1,512 ^{bc}
DT1C3	106,122 \pm 30,348 ^{cde}	19,461 ^{de}	9,702 \pm 0,809 ^{cde}
DT1C4	145,696 \pm 9,224 ^{cde}	47,503 \pm 3,28 ^{bc}	9,608 \pm 0,485 ^{cde}
DT2C1	165,725 \pm 18,407 ^{bc}	49,602 \pm 4,414 ^{bc}	8,611 \pm 0,637 ^{de}
DT2C2	63,04 \pm 5,103 ^e	17,042 \pm 2,983 ^{de}	9,03 \pm 0,386 ^{cde}
DT2C3	69,45 \pm 43,764 ^{de}	14,978 \pm 5,145 ^{de}	11,534 \pm 0,741 ^{cde}
DT2C4	151,889 \pm 5,677 ^{bcd}	54,853 \pm 2,248 ^b	13,495 \pm 1,027 ^{bcd}
DT3C1	62,482 \pm 23,012 ^e	14,055 \pm 2,905 ^e	7,12 \pm 3,664 ^e
DT3C2	78,69 \pm 1,924 ^{de}	20,214 \pm 1,561 ^{de}	12,512 \pm 1,664 ^{cde}
DT3C3	102,254 \pm 7,364 ^{cde}	24,543 \pm 4,116 ^{cde}	22,627 \pm 4,986 ^a
DT3C4	138,87 \pm 20,208 ^{cde}	32,472 \pm 10,752 ^{bcd}	11,299 \pm 0,953 ^{cde}
DT4C1	235,033 \pm 17,362 ^{ab}	58,02 \pm 4,705 ^b	13,1 \pm 1,213 ^{cd}
DT4C2	150,215 \pm 35,327 ^{bcd}	40,509 \pm 7,23 ^{bcd}	7,072 \pm 0,917 ^e
DT4C3	155,946 \pm 49,613 ^{bcd}	38,653 \pm 13,596 ^{bcd}	12,171 \pm 0,73 ^{cde}
DT4C4	169,757 \pm 53,052 ^{bc}	41,373 \pm 17,083 ^{bcd}	13,077 \pm 1,307 ^{cd}

Apêndice D (Continuação)

Grupos	α-Caroteno ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW)	trans-β-Caroteno ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW)	cis-β-Caroteno ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW)
Controle	57,528 \pm 9,087 ^{def}	383,859 \pm 55,479 ^{cde}	163,86 \pm 27,237 ^{cd}
DT1C1	100,907 \pm 9,751 ^a	538,355 \pm 60,771 ^{ab}	254,018 \pm 32,815 ^{ab}
DT1C2	65,552 \pm 0,442 ^{cde}	455,071 \pm 9,265 ^{bc}	200,437 \pm 4,762 ^{bc}
DT1C3	30,972 \pm 7,13 ^{gh}	314,033 \pm 36,435 ^{defg}	158,871 \pm 26,2 ^{cd}
DT1C4	30,938 \pm 4,246 ^{gh}	241,582 \pm 26,341 ^{fg}	100,77 \pm 22,391 ^{ef}
DT2C1	85,099 \pm 1,966 ^{ab}	346,95 \pm 6,782 ^{cdef}	157,248 \pm 7,673 ^{cde}
DT2C2	58,852 \pm 0,366 ^{cde}	307,016 \pm 14,343 ^{efg}	143,721 \pm 8,572 ^{cdef}
DT2C3	58,855 \pm 6,487 ^{cde}	404,482 \pm 59,071 ^{cde}	169,275 \pm 14,937 ^{cd}
DT2C4	74,346 \pm 2,777 ^{bc}	428,118 \pm 20,226 ^{bcd}	181,391 \pm 11,128 ^{cd}
DT3C1	19,037 \pm 5,768 ^h	123,936 \pm 23,088 ^h	42,389 \pm 9,868 ^g
DT3C2	51,015 \pm 3,763 ^{ef}	362,471 \pm 39,686 ^{cde}	164,733 \pm 13,084 ^{cd}
DT3C3	56,321 \pm 4,847 ^{def}	604,888 \pm 71,847 ^a	275,744 \pm 33,826 ^a
DT3C4	32,559 \pm 4,901 ^{gh}	348,867 \pm 39,967 ^{cdef}	139,546 \pm 18,29 ^{def}
DT4C1	72,451 \pm 5,289 ^{bcd}	373,645 \pm 34,528 ^{cde}	172,489 \pm 16,002 ^{cd}
DT4C2	34,822 \pm 4,717 ^{gh}	219,621 \pm 24,599 ^{gh}	93,392 \pm 18,196 ^{fg}
DT4C3	42,659 \pm 3,787 ^{fg}	294,972 \pm 19,742 ^{efg}	133,906 \pm 9,081 ^{def}
DT4C4	55,619 \pm 4,123 ^{ef}	325,089 \pm 17,429 ^{defg}	135,523 \pm 10,796 ^{def}

ANEXO A

Reconstrução da relação das algas verdes baseada em dados de biologia molecular (LELIAERT *et al.*, 2012).

